

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**VÍAS ALTERNATIVAS DE PRESENTACIÓN DE
ANTÍGENOS DEL VIRUS VACCINIA POR MHC DE
CLASE I**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Silvia Lázaró García

Bajo la dirección de los doctores

**Margarita del Val Latorre
Salvador Iborra Martín**

Madrid, 2013

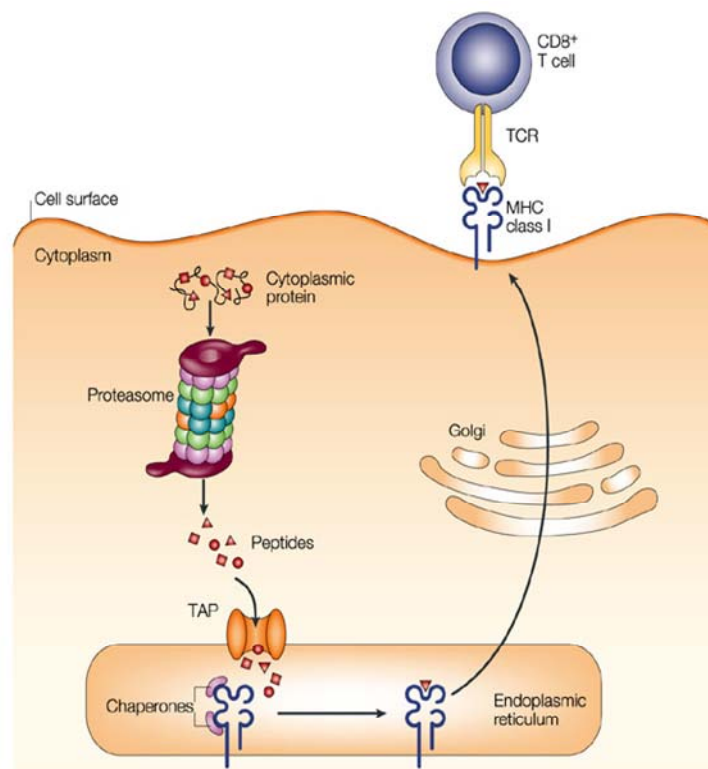
©Silvia Lázaró García, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I

Vías alternativas de presentación de antígenos del virus Vaccinia por MHC de clase I



SILVIA LÁZARO GARCÍA

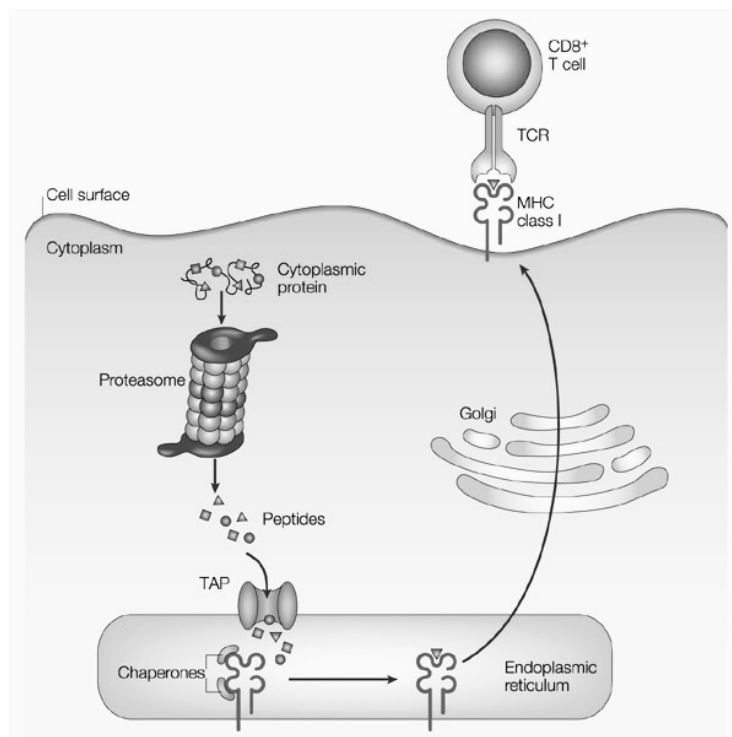
TESIS DOCTORAL
MADRID 2012



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I

Vías alternativas de presentación de antígenos del virus Vaccinia por MHC de clase I



SILVIA LÁZARO GARCÍA

TESIS DOCTORAL
MADRID 2012

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Unidad de Inmunología Viral del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III y en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa bajo la dirección de la Dra. Margarita del Val Latorre y del Dr. Salvador Iborra Martín.

Tutor: Dr. Eduardo Martínez Naves

Portada: Jonathan W. Yewdell, Eric Reits & Jacques Neefjes. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* **3**, 952-961 (December 2003) doi:10.1038/nri1250.

A mi hermano Javier

Índice

1. Abreviaturas	6
2. Introducción	8
2.1. Procesamiento de antígenos presentados por MHC de clase I a CTL.	8
2.1.1. El proteasoma.	9
2.1.2. Aminopeptidasas y endopeptidasas citosólicas implicadas en procesamiento antigénico.	12
2.1.3. Transportadores de antígenos.	15
2.1.3.1. Transportador asociado a procesamiento de antígeno, TAP.	15
2.1.3.2. Mecanismos virales de inhibición de TAP.	16
2.1.3.3. Vías alternativas de transporte de péptidos presentados por MHC de clase I.	17
2.1.3.4. Aminopeptidasas de RE asociadas al procesamiento de antígeno.	18
2.1.4. Carboxipeptidasas de la vía secretoria asociadas al procesamiento de antígenos.	21
2.1.5. Endoproteasas vesiculares implicadas en procesamiento endógeno de antígenos.	21
2.1.6. Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I.	24
2.1.7. El complejo de carga.	26
2.2. Características de los ligandos de MHC de clase I independientes de TAP.	26
2.3. Activación de linfocitos T CD8⁺.	28
2.4. El virus vaccinia.	30
2.4.1. El ciclo replicativo del virus.	30
2.4.2. Respuesta inmune frente a VACV.	33
2.4.3. Epítomos de VACV presentados por MHC de clase I a linfocitos T CD8 ⁺	34
2.4.4. Los VACV recombinantes (rVACV) en el estudio de la respuesta inmune celular y como vector vacunal.	35
3. Objetivos	38
4. Materiales y métodos	40
4.1. Reactivos	40
4.1.1. Medios de cultivo.	40
4.1.2. Productos químicos.	40
4.1.3. Productos inmunoquímicos.	42
4.1.4. Péptidos.	42
4.1.5. Líneas celulares y células primarias.	43
4.1.6. Virus vaccinia.	44
4.2. Permeabilización reversible de células con estreptolisina o y saponina.	44
4.3. Infecciones virales.	45
4.3.1. Producción, purificación y titulación de virus.	45
4.3.2. Infecciones virales y coinfecciones.	45
4.4. Inmunización de ratones.	46
4.5. Linfocitos T.	46
4.5.1. Purificación de linfocitos T CD8 ⁺ a partir de esplenocitos obtenidos <i>ex vivo</i>	46

4.5.2. Obtención y mantenimiento de líneas de CTL policlonales monoespecíficas de epítomos.	47
4.5.3. Ensayos funcionales de presentación de antígeno a CTL.	47
4.5.3.1. Ensayo de ICS con linfocitos T obtenidos <i>ex vivo</i> y con líneas de CTL.	48
4.5.3.2. Ensayos de citotoxicidad.	48
4.6. Análisis estadísticos y bases de datos.	49
5. Resultados.	50
5.1. Inhibición de TAP mediante ICP47.	50
5.1.1. Permeabilización de células con estreptolisina O y saponina.	50
5.1.2. Efecto de la inhibición de TAP en la presentación antigénica empleando un rVACV que expresa ICP47.	52
5.1.3. Efecto de la inhibición de TAP en la presentación de un epítipo propio de VACV empleando el rVACV que expresa ICP47.	54
5.2. Identificación y cuantificación de la presentación independiente de TAP de antígenos de VACV.	56
5.2.1. Respuesta primaria específica de linfocitos T CD8 ⁺ deficientes en TAP frente a células infectadas por VACV.	56
5.2.2. Respuesta primaria específica de linfocitos T CD8 ⁺ silvestres frente a células deficientes en TAP e infectadas por VACV.	57
5.2.3. Cuantificación global de la presentación directa e independiente de TAP de antígenos de VACV.	62
5.3. Identificación de los epítomos de VACV que se presentan de forma independiente de TAP.	63
5.3.1. Respuesta primaria de linfocitos T CD8 ⁺ específicos frente a epítomos individuales de VACV.	63
5.3.2. Establecimiento in vitro de líneas de CTL específicas frente a epítomos de VACV derivadas de ratones C57BL/6 y reconocimiento de BMDC infectadas.	67
5.3.3. Reconocimiento de células infectadas por líneas de CTL específicas frente a epítomos de VACV derivadas de ratones C57BL/6.	70
5.3.4. Establecimiento in vitro de líneas de CTL específicas frente a epítomos de VACV derivadas de ratones deficientes en TAP y reconocimiento de BMDC infectadas.	72
5.4. Caracterización de las vías de procesamiento antigénico de los epítomos de VACV.	74
5.4.1. Papel global del proteasoma en el procesamiento antigénico en células infectadas por VACV.	74
5.4.2. Papel global de la TPPII en el procesamiento antigénico en células infectadas por VACV.	75
5.4.3. Identificación y análisis de los epítomos de VACV resistentes a LC.	76
5.4.4. Caracterización del procesamiento de los epítomos de VACV independientes de TAP en células deficientes en TAP. Efecto de distintos inhibidores.	79
5.5. Análisis de las características de los epítomos de VACV.	83
5.5.1. Características de las proteínas de origen de los epítomos.	83
5.5.2. Hidrofobicidad de los epítomos de VACV.	86
5.5.3. Motivos de anclaje preferenciales a MHC de clase I.	88
5.5.4. Localización de los epítomos en las proteínas de origen.	89

5.5.5. Características de los epítomos de VACV independientes de TAP asociadas a la inmunodominancia en ratones deficientes en TAP.	91
5.6. Estudio de la respuesta inmune y del control de la infección por VACV tras la vacunación en el modelo murino deficiente en TAP.	93
5.6.1. La inmunización con dos péptidos que se presentan de forma independiente de TAP aumentó la respuesta específica de linfocitos T CD8 ⁺ frente a una infección posterior con VACV de ratones C57BL/6 o deficientes en TAP.	93
5.6.2. La vacunación con los péptidos que se presentan de forma independiente de TAP controló la infección posterior con VACV en ratones C57BL/6 o deficientes en TAP.	95
6. Discusión	96
6.1. Sistema de inhibición de TAP mediante ICP47.	96
6.2. Análisis global de la presentación de antígenos de VACV por vías alternativas.	97
6.3. Identificación y caracterización de los epítomos de VACV que se presentan por vías alternativas a linfocitos T CD8⁺.	98
6.3.1. Identificación y caracterización del procesamiento antigénico alternativo de los epítomos de VACV.	98
6.3.1.1. Epítomos presentados por la vía clásica dependiente del proteasoma y de TAP. ...	98
6.3.1.2. Epítomos cuya presentación es dependiente de TAP pero resistente a inhibidores del proteasoma.	100
6.3.1.3. Epítomos presentados independientemente de TAP	100
6.3.1.4. Epítomos cuya presentación es independiente de TAP pero mediada por el proteasoma.	103
6.3.2. Análisis de las características de los epítomos de VACV que siguen vías alternativas de procesamiento y presentación antigénica.	105
6.3.3. Análisis de las características de las proteínas de VACV de las que derivan los epítomos.	107
6.4. Relevancia fisiológica de la presentación independiente de TAP.	114
7. Conclusiones	116
8. Bibliografía.....	124

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Margarita del Val que desde el primer día me animase a venirme a Madrid y darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección, por darme libertad en la realización de los experimentos y por su comprensión en los momentos difíciles durante estos 6 años. Quiero agradecer enormemente la codirección de Salvador Iborra, que me ayudado diariamente en el diseño y en la realización de los experimentos, por cederme tus ideas, por aportarme nuevas ideas cada día y por enseñarme que sin esfuerzo no se consiguen resultados. Gracias por vacunar y proteger a mis ratones frente a la infección por VACV.

Quiero agradecer a la Dra Gabrielle Niedermann que nos cediera los fémures de ratones deficientes en TPPII. Agradecer al Servicio de Proteómica del ISCIII la síntesis de los péptidos de VACV y en especial a Mercedes por resolver mis dudas. Gracias a la Unidad de Inmunobiología del ISCIII por el mantenimiento de los citómetros de flujo haciéndome posible mi trabajo diario. Y en la última etapa de escritura, agradecer a Ugo Bastolla del Servicio de Bioinformática del CBM su ayuda con cuestiones un poco hidrofóbicas.

Gracias a Carmen Mir, a Susana Sánchez y a Yolanda Laó por su apoyo técnico y por tener siempre a punto todo aquello que era necesario en la realización de los experimentos. Agradezco a Daniel López, a Luis Antón y a Manuel Ramos sus continuas aportaciones en los seminarios.

En general, gracias a todos mis compañeros de Inmunología Viral y de Presentación de Antígeno; aquellos que han pasado por allí durante estos 6 años y a los que todavía están por aquí, sin vuestro trabajo no habría sido posible realizar esta tesis. Más importante aún, quiero agradecer profundamente a cada uno de vosotros que seáis mis amigos y que hayáis compartido conmigo todos esos momentos que sólo vosotros y yo sabemos:

Mil gracias por cuidar de mí a diario a Carmen, a Susana, a Alicia y a Yoli. Gracias a Carmen por purificar mis stocks virales y purificar mi mente con todos tus consejos tanto laborales como personales. En especial, quiero agradecer a Susana las continuas titulaciones virales y el mantenimiento de mis líneas de CTL y de nuestra amistad durante estos años compartiendo juntas tantas y tantas cosas. A Alicia, gracias por aportarme nuevas miras en el análisis y diseño de datos y resolverme siempre todas las dudas entre risas. A Yoli, por estar pendiente de mis cosas y enseñarme a verlas de otra forma. A Salva, gracias ser mi amigo, preocuparte por mis cosas y hacer que todo vaya sobre ruedas. Muchas gracias a David Molina por ayudarme a organizar mis ideas y por tu compañerismo y tu amistad dentro y fuera del laboratorio. Gracias a Carolina por ser la primera persona que me enseñó a infectar las células y a escribir esos protocolos tan elaborados a la vez que pasábamos las tardes juntas, y a Manu por esas tardes en Majadahonda en las que me escuchabas mientras yo no paraba de hablarte. Muy especialmente dar las gracias a mi nuevo compañero David Gamarra por tus diseños gráficos, por tus investigaciones a través de los valores que han dado un nuevo sentido a mis datos y a la vez por escucharme durante horas. Sin ti esta tesis no sería la misma, desde la portada hasta los últimos resultados.

Y agradecer a otros muchos compañeros del ISCIII los ratos pasados juntos durante esta tesis, muchos de ellos en cafetería, gracias a Eva, a Paco, a Yolanda Campos, a Elena, a Ruth, a David, a Andrés y a Jose.

A mis compañeros de la Universidad de Salamanca por acompañarme en aquellos años de clases y prácticas que desembocaron en la realización de esta tesis: Juan, Fedra, María, Bea y Ruth. En especial a Juan, por ser un buen profesor y enseñarme tantas cosas y por tu amistad desde el primer año de carrera hasta ahora.

A todos mis amigos desde que íbamos juntos al instituto: Ángela, Blanca, Maria Jose, Begoña, Curro y Matías por alegrarme todos aquellos momentos fuera del trabajo diario de estas tesis.

A mis padres, por vuestro amor incondicional y vuestra comprensión. Por la educación recibida tanto a nivel académico como a nivel ético y moral. Por darme libertad en la elección de mis opciones en la vida a pesar de que eso suponga estar separados. Por estar siempre ahí, en todo momento.

A mi hermano mayor, Javier, por cuidar de mí desde que era un bebé. Por animarme a emprender estos caminos desde que era una niña a la que le encantaban las películas sobre pandemias que amenazaban el mundo. Por creer, por animarme, por confiar, por apostar por mí siempre y por tu apoyo incondicional te dedico esta tesis.

Gracias Javi

1. ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ACE	Enzima carboxi-dipeptidasa convertasa de angiotensina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Células presentadoras de antígeno
ARN(m)	Ácido ribonucleico (mensajero)
ATP	Adenosin trifosfato
BFA	Brefeldina A
BH	Bleomicina hidrolasa
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea (<i>Bone marrow dendritic cells</i>)
CEV	Virión envuelto asociado a la célula (<i>Cell-associated enveloped virus</i>)
CMV	Citomegalovirus
CTL	Linfocito T citotóxico CD8 ⁺
d.p.i.	Días tras la infección
DC	Célula dendrítica
decRVKR-cmk	Decanoil-peptidil-clorometilcetona
DRiPs	Productos ribosomales defectivos
DTT	Ditiotreitol
E:D	Efector:diana
EBV	Virus de Epstein Barr
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EEV	Virión envuelto extracelular (<i>Extracellular enveloped virus</i>)
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERAD	Degradación asociada al RE
ERAP	Aminopeptidasa del RE
ERGIC	Compartimento intermedio entre RE y Golgi
Fsig-	Proteína F de RSV que carece de la secuencia señal.
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescent protein</i>)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
h	horas
H-2	Complejo principal de histocompatibilidad en el ratón (Histocompatibilidad-2)
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	Antígeno leucocitario humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HSV-1	Virus herpes simplex tipo I
i.p.	Intraperitoneal
ICS	Ensayo de tinción intracelular de citoquinas
IDE	Enzima degradadora de insulina (<i>Insulin degrading enzyme</i>)
IEV	Virión envuelto intracelular (<i>Intracellular enveloped virus</i>)
IFN	Interferón
IL-2	Interleuquina 2
IMV	Virión maduro intracelular (<i>Intracellular mature virus</i>)
IRAP	Aminopeptidasa regulada por insulina

IV	Virión inmaduro (<i>Immature virus</i>)
kD	Kilodalton
LAP	Leucín-aminopeptidasa
LC	Lactacistina
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
m.o.i.	Multiplicidad de infección
mAb	Anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
min	minutos
MVA	Cepa no replicativa de VACV (<i>Modified virus Ankara</i>)
Ova	Ovoalbúmina
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PC7	Proprotein convertasa 7
PECs	Células del lavado peritoneal
PSA	Aminopeptidasa sensible a puromicina
RE	Retículo endoplasmático
ROC	Análisis estadístico " <i>Receiver-Operating Characteristic</i> "
RSV	Virus respiratorio sincitial
rVACV	Virus vaccinia recombinante
SBF	Suero bovino fetal
SEM	Error estándar de la media
SLO	Estreptolisina O
SP	Peptidasa señal
SPP	Peptidasa del péptido señal
TAP	Transportador asociado a procesamiento de antígeno
TAP ^{-/-}	Ratones o células deficientes en TAP
TAP ^{+/+}	Ratones o células que expresan TAP, habitualmente de origen C57BL/6
TCR	Receptor de células T
TM	Transmembrana
TOP	Oligopeptidasa thimet
TPPII	Tripeptidil peptidasa II
u.f.p.	Unidad formadora de placa
VACV	Virus vaccinia
WR	Cepa silvestre de vaccinia (<i>Western reserve</i>)
β ₂ m	β ₂ microglobulina
ΔB8R	Virus VACV que no tiene el gen B8R

2. INTRODUCCIÓN

2.1. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS PRESENTADOS POR MHC DE CLASE I A CTL.

Los linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ (CTL) exploran la superficie de todas las células del cuerpo para detectar un tumor o la infección por un patógeno y eliminarlo. Su receptor de células T (TCR) reconoce péptidos que son presentados en la superficie de cualquier célula por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Estos péptidos proceden del procesamiento proteolítico de proteínas endógenas propias y extrañas o proteínas exógenas, en el caso de la presentación cruzada por células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Estos péptidos presentan un tamaño medio de 9 aminoácidos (aa) y frecuentemente derivan de precursores más largos que requieren un recorte proteolítico previo a su unión a moléculas de MHC de clase I. El reconocimiento específico de los complejos MHC/péptido por el TCR de los CTL provoca su activación y proliferación, promoviendo la eliminación de la célula infectada o tumoral por su acción citotóxica o por la liberación de citocinas.

En la vía clásica de procesamiento antigénico (Figura 1), los péptidos antigénicos derivan de la degradación en el citosol de proteínas endógenas o de productos defectivos de la traducción (DRIPs) por el proteasoma. Los productos del proteasoma son principalmente péptidos de menos de 8 aa, pero también se generan péptidos de 8 o más aa que pueden incluir epítopos o sus precursores. Estos precursores pueden presentar extensiones de varios residuos en el extremo amino que pueden ser recortadas por aminopeptidasas citosólicas. Los péptidos generados son transportados al retículo endoplasmático (RE) a través del transportador asociado a procesamiento de antígeno (TAP). En el retículo endoplasmático pueden ser sustrato de otras aminopeptidasas como las aminopeptidasas del RE (ERAP). Los péptidos son cargados en un complejo formado por la cadena pesada nascente de MHC de clase I y la proteína β_2 microglobulina (β_2m). El complejo estable MHC/péptido es transportado a través de la vía secretoria constitutiva hasta la superficie celular donde puede ser reconocido por linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ que eliminan eficazmente la célula infectada.

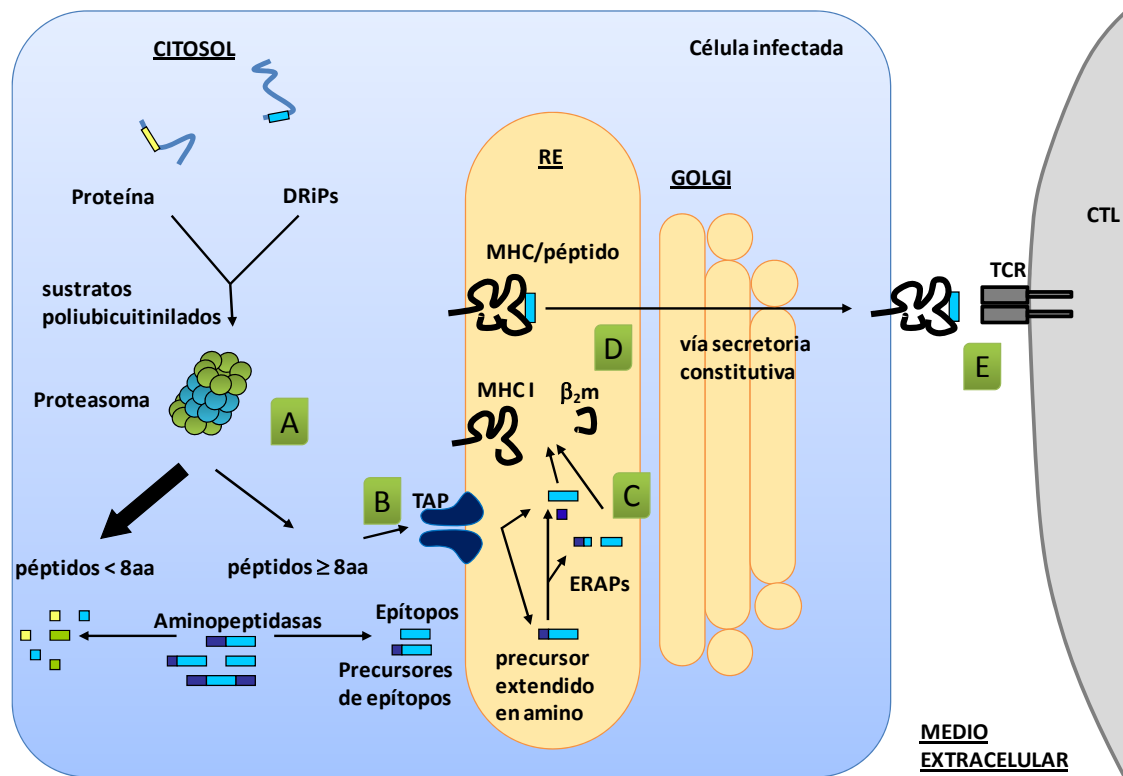


Figura 1. La vía clásica de procesamiento y presentación de antígeno por MHC de clase I a CTL.

En la vía clásica de procesamiento de antígeno los péptidos presentados a CTL derivan de la actividad degradativa del proteasoma en el citosol. Los sustratos del proteasoma están ubiquitinados, y son mayormente productos ribosomales defectivos (DRiPs) o proteínas endógenas. Los productos del proteasoma son principalmente péptidos de menos de 8 aa, pero también se generan péptidos de 8 o más aa que pueden incluir epítopos o sus precursores. Los péptidos producidos por el proteasoma son sustrato de aminopeptidasas citosólicas (A). Los péptidos citosólicos de más de 8 aa son transportados al RE por los transportadores TAP (B). En el RE las aminopeptidasas ERAPs recortan precursores extendidos en el extremo amino generando epítopos, aunque también puede destruirlos (C). Con la ayuda de chaperonas de RE el epítipo final se ensambla en un complejo trimolecular estable con la cadena pesada de MHC de clase I y la proteína β_2m (D). El complejo de MHC de clase I cargado con el epítipo (MHC/péptido) es exportado por la vía secretoria constitutiva hasta la superficie celular para su presentación a CTL. El reconocimiento de un complejo MHC/péptido cargado con un epítipo viral por un CTL específico de ese epítipo ocurre a través del TCR (E), y desencadena la activación del CTL que induce la apoptosis de la célula diana.

2.1.1. El proteasoma.

El proteasoma es la principal endoproteasa degradativa de las células. Se encuentra altamente conservado y está localizado en el citosol y en el núcleo. El proteasoma 26S es el complejo multiproteico con actividad proteolítica del sistema ubiquitina-proteasoma. El proteasoma degrada sustratos poliubiquitinilados a través de

la cascada enzimática constituida por E1, E2 y E3, que transfieren múltiples ubiquitinas a los grupos ϵ -amino de las lisinas de los sustratos proteicos a degradar. El proteasoma 26S está formado por un núcleo catalítico 20S y por dos subunidades reguladoras 19S colocadas a ambos lados del núcleo [19S-20S-19S], que son responsables de la unión y del desplegamiento de los sustratos poliubiquitinilados. El núcleo 20S está compuesto por 28 subunidades no idénticas que se apilan en 4 anillos generando una estructura en forma de barril. Cada anillo externo está formado por 7 subunidades α cuya función es impedir el paso indiscriminado de los sustratos. El paso de los sustratos y la salida de los productos se producen por un cambio de orientación de las subunidades α externas del núcleo 20S al interaccionar con el complejo activador PA28 y con la subunidad reguladora 19S. Los 2 anillos internos constan cada uno de 7 subunidades β catalíticas y su función es generar un hueco central donde se realiza la degradación de los sustratos. Las subunidades catalíticas del sitio activo tienen diferentes actividades, $\beta 1$ tipo caspasa, $\beta 2$ tipo tripsina y $\beta 5$ tipo quimiotripsina. Cualquier aminoácido puede servir de sitio de corte por lo que el proteasoma tiene baja especificidad de corte.

El proteasoma es la principal proteasa que se ha implicado en la generación de epítopos de MHC de clase I por varias razones: Primero, la inhibición de la actividad del proteasoma con inhibidores específicos elimina casi por completo la presentación de ciertos antígenos por MHC de clase I y afecta fuertemente, aunque de forma variable para distintos alotipos, a la expresión de las moléculas de MHC de clase I en membrana. Además, la ausencia de actividad carboxipeptidasa significativa en el citosol (Reits y col. 2003; Reits y col. 2004) y en el RE de células de rata (Powis y col. 1996) parecía implicar que el extremo carboxilo de ligandos de MHC de clase I debe ser generado por una endoproteasa. Se ha demostrado de hecho que el proteasoma genera el extremo carboxilo correcto de ciertos epítopos que se presentan a CTL (Shastri y col. 2005). La reciente descripción de la importante implicación de la enzima carboxi-dipeptidasa convertasa de angiotensina (ACE) de la vía secretoria en la generación del extremo carboxilo de ciertos epítopos (Shen y col. 2011) ha matizado el papel exclusivo del proteasoma en esta función.

Segundo, el proteasoma genera péptidos de 3 a 22 residuos de los cuales un 15% presenta una longitud entre 8-10 aa, ideal para unirse a moléculas de MHC de clase I y

alrededor de un 20 % presentan una longitud mayor y son precursores potenciales (Kisselev y col. 1999).

Tercero, la presencia de interferón (IFN) γ induce que se incorporen a los proteasomas nacientes tres nuevas subunidades β -catalíticas, LMP2, MELC-1 y LMP7, que reemplazan a las subunidades catalíticas constitutivas β 1, β 2 y β 5, respectivamente. Estos proteasomas se denominan inmunoproteasomas y se localizan constitutivamente en tejidos linfoides como el timo, el bazo o ganglios linfáticos y bajo la estimulación por IFN γ se expresan en otros tipos celulares. Los inmunoproteasomas tienen una especificidad de corte distinta a los proteasomas estándares, pudiéndose generar un subconjunto de péptidos distinto o con una eficiencia distinta (Kloetzel y Ossendorp 2004; Sijts y Kloetzel 2011).

La principal función del proteasoma es la degradación de proteínas con fallos en el plegamiento para el reciclaje de aa y el recambio de proteínas que ya han cumplido su función. Las proteínas que acceden al RE y que no pasan el control de calidad deben ser retrotranslocadas al citosol para su degradación a través de la ruta de degradación asociada al RE (ERAD) en la que interviene el transportador bidireccional Sec61 o translocón (Wiertz y col. 1996). Los DRiPs, productos ribosomales defectivos, representan la principal, pero no la única, fuente de péptidos que se presentan por MHC de clase I. La hipótesis de los DRiPs explica la rápida presentación de péptidos virales en la superficie de las células infectadas ya que conecta la traducción de la proteína defectiva a la maquinaria de procesamiento de antígeno (Del Val y López 2002; Princiotta y col. 2003; Yewdell y Nicchitta 2006; Dolan y col. 2011).

Bajo condiciones proinflamatorias se generan una gran cantidad de proteínas oxidadas y desplegadas que sobrepasan la actividad degradativa del sistema ubiquitina-proteasoma acumulándose en la célula. La función principal del inmunoproteasoma bajo estas condiciones es contribuir a mantener la homeostasis de las proteínas y como resultado de la actividad degradativa conjunta del proteasoma y del inmunoproteasoma puede aumentar la diversidad de péptidos accesibles para la presentación de antígeno por MHC de clase I.

2.1.2. Aminopeptidasas y endopeptidasas citosólicas implicadas en procesamiento antigénico.

Además del proteasoma, otras proteasas participan en el procesamiento antigénico. Se describirán individualmente y se recogen en la Tabla 1.

El citosol es un medio muy agresivo en el que existen numerosas peptidasas que degradan rápidamente los péptidos. En concreto, el análisis con péptidos marcados introducidos en células vivas indica que se degradan en segundos, y exclusivamente por aminopeptidasas, ya que péptidos protegidos en el extremo amino son estables (Reits y col. 2003; Reits y col. 2004). Las aminopeptidasas citosólicas colaboran en degradar los péptidos hasta aa, un proceso crítico para la supervivencia celular, pero además pueden recortar precursores extendidos en el extremo amino, bien para generar el extremo correcto de ligandos de MHC de clase I, o bien para destruirlo. A pesar de que la mayor parte de los productos del proteasoma requieren un recorte proteolítico para generar el extremo amino correcto, se ha descrito el caso excepcional de un ligando natural de 15 aa con 6 aa extendidos en su extremo amino que no se recortan y se presenta a CTL (Samino y col. 2006).

Se han descrito varias aminopeptidasas citosólicas, como por ejemplo, leucín-aminopeptidasa (LAP), bleomicina hidrolasa (BH) o la aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA). LAP es una metalopeptidasa que prefiere aa hidrofóbicos en el extremo amino (Turzynski y Mentlein 1990), que se induce por IFN γ , y que promueve la generación de un epítipo *in vitro* a partir de un péptido extendido en el extremo amino (Beninga y col. 1998). PSA y BH pueden recortar extensiones en el extremo amino de péptidos largos para generar *in vitro* el epítipo correcto (Stoltze y col. 2000; Lévy y col. 2002). Sin embargo, también hay epítipos que no se benefician de estas aminopeptidasas. Los ratones deficientes en cada una de estas aminopeptidasas muestran una expresión normal de moléculas de clase I en superficie y una respuesta de linfocitos T CD8⁺ frente a distintos epítipos virales idéntica a los ratones silvestres (Towne y col. 2005; Towne y col. 2007). Sólo se ha observado un incremento en la expresión de MHC de clase I en DC esplénicas de ratones deficientes en PSA, pero no se traduce en una mejor respuesta antiviral de linfocitos T CD8⁺ (Towne y col. 2008).

Localización subcelular	Vía clásica	Vías alternativas
	Peptidasas y proteasas	
Citosol	Proteasoma	Leucín-aminopeptidasa (LAP) Bleomicina hidrolasa (BH) Aminopeptidasa sensible a puromicina (PSA) Tripeptidil peptidasa II (TPPII) Caspasas 5 y 10 Enzima degradadora de insulina (IDE) Oligopeptidasa thimet (TOP) Nardilisina
RE y vías vesiculares	ERAP Enzima convertasa de angiotensina (ACE)	Peptidasa señal (SP) Peptidasa del péptido señal (SPP) Furina Protein convertasa 7 (PC7) Catepsinas
Mecanismos de transporte		
RE	TAP	Secuencia señal vía Sec61

Tabla 1. Peptidasas, proteasas y mecanismos de transporte que participan en el procesamiento de antígenos de MHC de clase I.

Se comparan las distintas actividades proteolíticas y mecanismos de transporte de la vía clásica y de vías alternativas, además de su localización subcelular.

La tripeptidil peptidasa II (TPPII) es una aminopeptidasa citosólica de la familia de las subtilisinas que participa en numerosos procesos celulares: división celular, apoptosis, o en enfermedades como obesidad o cáncer. TPPII retira tripéptidos del extremo amino de los sustratos a no ser que encuentre una P (Tomkinson 1999) y tiene además actividad endoproteasa de tipo tripsina. Los péptidos de más de 15 aa son procesados principalmente por la TPPII y no por otras aminopeptidasas por lo que podría tener un papel como peptidasa de recorte citosólica de productos largos del proteasoma (Reits y col. 2004; York y col. 2006). Se han descrito, en ensayos en cultivo con inhibidores específicos de la actividad TPPII o con ARN de interferencia, algunos epítopos que siendo insensibles a inhibidores del proteasoma son procesados por la TPPII, como un epítipo de nef del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Seifert y col. 2003) y otro de LMP1 del virus de Epstein Barr (EBV) (Diekmann y col. 2009). Además, la TPPII, también está implicada en la presentación de otro epítipo de LMP1 y del epítipo de la nucleoproteína del virus de la gripe, NP-147-155, los cuales se

potencian en presencia de inhibidores del proteasoma por lo que parecen sufrir su acción destructora (Guil y col. 2006; Diekmann y col. 2009).

Varios grupos han examinado la presentación de antígenos *in vivo* en ratones deficientes en TPPII, observándose un ligero incremento en la expresión en superficie de MHC de clase I y en la presentación directa de antígenos virales de LCMV (Kawahara y col. 2009) o en la presentación cruzada del epítipo SIINFEKL de ovoalbúmina (Ova) (Firat y col. 2007). Por tanto, el efecto global de la TPPII en la producción de epítopos de MHC de clase I sugiere un papel ligeramente destructor de esta peptidasa.

Varios estudios describen múltiples endoproteasas que complementan la acción del proteasoma o actúan de forma independiente generando epítopos presentados por MHC de clase I.

Las caspasas son endoproteasas que forman parte de una familia de cisteín-proteasas citosólicas que participan en respuesta inflamatoria y en procesos de apoptosis. Así, se ha descrito que las caspasas 5 y 10 participan independientemente del proteasoma en la producción de un epítipo de citomegalovirus murino, CMV, en células apoptóticas infectadas con un virus vaccinia recombinante (rVACV), y sólo la inhibición de ambas proteasas y del proteasoma consigue eliminar totalmente la presentación del epítipo (López y col. 2010).

La enzima degradadora de insulina (IDE) es una metaloproteasa ubicua que corta la cadena de la insulina y péptidos de un peso molecular menor de 12 kD. Esta enzima reconoce la conformación del sustrato recortando preferencialmente sustratos con estructura primaria de lámina beta. Se ha descrito un epítipo de la proteína tumoral MAGE-3 presentado por HLA-A1 que es independiente de proteasoma y cuyo procesamiento en el citosol se produce por la IDE (Parmentier y col. 2010).

La oligopeptidasa thimet (TOP) es una endoproteasa citosólica ubicua que es fundamentalmente degradativa de epítopos (Saric y col. 2001), pero también puede generar péptidos precursores (Saric y col. 2004) por ejemplo de la proteína tumoral MART-1 (Kessler y col. 2011). También puede recortar péptidos pudiendo generar el extremo carboxilo de un ligando de MHC de clase I tras recortar 2 ó 3 residuos del extremo carboxilo generando de forma resistente a inhibidores del proteasoma el epítipo de la proteína tumoral PRAME (Kessler y col. 2011).

La nardilisina es una endopeptidasa citosólica que reconoce motivos dibásicos, y que participa en la generación de péptidos precursores de la proteína tumoral PRAME y en la generación del extremo amino correcto del epítipo EBNA3C (Kessler y col. 2011).

2.1.3. Transportadores de antígenos.

2.1.3.1. Transportador asociado a procesamiento de antígeno, TAP.

En la vía clásica de presentación antigénica mediada por MHC de clase I los TAP son un elemento central. TAP pertenece a la familia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) y su función principal es translocar péptidos, que generalmente proceden de la degradación por el proteasoma, desde el citosol al lumen del RE. Su localización canónica es la membrana del RE, aunque se ha observado la presencia de TAP en ERGIC (compartimento intermedio entre RE y Golgi) y en el Golgi (Ghanem y col. 2010). TAP es un heterodímero formado por dos subunidades, TAP1 y TAP2, ambas necesarias para formar un poro con un diámetro que permite el paso de los péptidos de forma unidireccional al RE. Cada subunidad consta de varios dominios transmembrana (TM) y de un dominio citosólico hidrofílico donde se localiza el sitio de unión e hidrólisis del ATP. Cada una de las subunidades de TAP tiene 10 hélices en su región TM, de las cuales las seis hélices situadas en los extremos carboxilo forman el poro central y son esenciales y suficientes para la unión del péptido y la translocación al lumen. Las 4 hélices en los extremos amino son indispensables para la unión de la tapasina y actúan como plataforma para el ensamblaje del resto de componentes del complejo de carga. La unión de ATP a cada subunidad suministra la energía necesaria para la translocación de péptidos a través de TAP (Parcej y Tampe 2010).

Dado el polimorfismo de las moléculas de clase I, TAP debe tener una especificidad flexible de sustrato que permita suministrar un amplio rango de péptidos a todos los alotipos. TAP puede translocar péptidos con una longitud de 8-40 aa, lineales, ramificados o modificados. Gracias a las aminopeptidasas del RE (ERAPs) los péptidos que tienen extensiones en amino son recortados hasta un tamaño de 8-16 aa, ideal para unirse al surco de las moléculas de clase I (Saveanu y col. 2005). La especificidad de sustrato de TAP está restringida por el reconocimiento del residuo carboxilo terminal,

básico o preferiblemente hidrofóbico, y los 3 primeros residuos amino terminales (van Endert y col. 1995; Peters y col. 2003). El TAP murino prefiere aa hidrofóbicos en el extremo carboxilo del péptido y la influencia de los residuos amino terminales es mucho más baja que en el TAP humano (Burgevin y col. 2008).

2.1.3.2. Mecanismos virales de inhibición de TAP.

En la vía clásica de presentación de antígeno, TAP es un punto clave, de ahí que muchos virus hayan evolucionado adoptando estrategias que bloqueen el transporte de los péptidos.

La mayoría de los mecanismos descritos aparecen en la familia de los herpes virus. Estos virus tienen una baja tasa de mutación pero han desarrollado múltiples mecanismos de atenuación de la respuesta inmune para así interferir con el reconocimiento de la célula infectada. La proteína citosólica ICP47 del virus herpes simplex tipo I (HSV-1) actúa como un inhibidor que compite con los péptidos y se une a TAP humano con una afinidad nanomolar, pero no a TAP murino (Fruh y col. 1995; Hill y col. 1995; Ahn y col. 1996; Tomazin y col. 1996). Los primeros 32-34 residuos de la proteína son suficientes para bloquear la unión del péptido al transportador, la hidrólisis del ATP y el acceso de los péptidos al RE. De hecho, existe un péptido sintético, ICP47 1-35 que se corresponde con los 35 aa del extremo amino de la proteína ICP47 y que mantiene la capacidad de bloquear TAP y disminuir la presentación de antígenos dependientes de TAP (Galocha y col. 1997). Se ha descrito también la utilización de virus recombinantes que expresan la molécula ICP47 con los que se consigue bloquear la presentación de antígenos virales (Snyder y col. 1997).

Muchos virus herpes del género de los varicelovirus y el virus de la varicela expresan una glicoproteína de membrana, UL49.5, que bloquea a TAP de forma dual. No ejerce ningún efecto en la unión del péptido ni del ATP sino que provoca que TAP se mantenga constantemente en la conformación cerrada de transporte, evitando el paso de los sustratos. Por otro lado, UL49.5 induce la degradación de TAP por el proteasoma (Koppers-Lalic y col. 2005).

La glicoproteína de membrana US6 del citomegalovirus humano, CMV, bloquea la unión del ATP a TAP actuando desde la cara luminal del RE, cara opuesta al sitio de unión del ATP. Este inhibidor no bloquea la unión del péptido (Ahn y col. 1997).

El EBV bloquea la unión del péptido y del ATP a TAP mediante la proteína citosólica BNFL2 (Croft y col. 2009; Horst y col. 2009).

Recientemente se ha descrito por primera vez un inhibidor de TAP fuera de la familia de los herpes. Se ha identificado una proteína de membrana del poxvirus de la viruela bovina (CPXV12) que inhibe la translocación de los péptidos al lumen del RE a través de TAP (Alzhanova y col. 2009; Byun y col. 2009) al impedir la unión al ATP.

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna proteína del poxvirus vaccinia (VACV) que bloquee TAP. Sin embargo, VACV tiene una multitud de proteínas que actúan como inmunomoduladores (Perdiguero y Esteban 2009). Estas proteínas pueden actuar interfiriendo con la acción del IFN γ , por ejemplo B8. Otras proteínas actúan capturando o interfiriendo la acción de quimioquinas o citoquinas, algunos ejemplos serían las proteínas B13 y B16 que inhiben la acción de la IL-1 β al inhibir la caspasa 1 o al secuestrar la citoquina respectivamente (Kettle y col. 1997; Smith y col. 1997).

2.1.3.3. Vías alternativas de transporte de péptidos presentados por MHC de clase I.

Se ha demostrado la existencia de epítomos que se presentan en la superficie celular unidos a MHC de clase I en células deficientes en TAP. Además las rutas de presentación de antígeno independientes de TAP parecen suficientes para controlar las infecciones virales *in vivo* ya que personas genéticamente deficientes en TAP no son especialmente susceptibles a diversas infecciones, excepto algunas bacterianas, en comparación con personas normales, y son capaces de generar CTL específicos frente a ciertos epítomos virales (Gadola y col. 2000). También se han descrito varios casos de generación de una respuesta de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ específicos de diversos antígenos en ratones genéticamente deficientes en TAP (TAP^{-/-}) (Sigal y Rock 2000; Norbury y col. 2001; Medina y col. 2009). En los ratones TAP^{-/-} se ha determinado que el repertorio funcional de estos linfocitos T CD8⁺ muestra una diversidad normal en el uso de cadenas del TCR, lo que permite el reconocimiento de varios antígenos, con la excepción de una reducida frecuencia en el uso de la cadena V β 5, limitando la respuesta

frente a Ova (Sandberg y col. 1996). Sin embargo, no se ha estimado cuantitativamente cuál es la contribución real de la presentación independiente de TAP a una respuesta global frente a un patógeno complejo, que es un objetivo de esta tesis.

Hay muy pocos ejemplos de epítomos que no requieran de TAP pero sí de un procesamiento por el proteasoma descritos en la literatura (Tabla 2). Así, de los epítomos independientes de TAP en los que se ha analizado la participación del proteasoma en su procesamiento, más del 85% son procesados por otras proteasas. Los pocos péptidos que no requieren de TAP pero sí del proteasoma requieren además de un mecanismo de transporte del citosol al RE alternativo a TAP que les permita acceder a las moléculas de MHC de clase I. Así, se han propuesto la difusión pasiva, el translocón Sec61 o transportadores no identificados. Transportadores endolisosomales como TAP-L o mecanismos como la autofagia podrían permitir el acceso a compartimentos vesiculares más distales (Lautscham y col. 2003a; Münz 2010; Chemali y col. 2011).

Proteasoma	Epítomo	
	Número	%
Dependientes	2	12
Resistentes a inhibidores	14	88
Suma	16	100
Desconocido	20	
Total	36	

Tabla 2. Participación del proteasoma en el procesamiento de epítomos independientes de TAP.

Se muestra el número de epítomos endógenos e independientes de TAP descritos en la literatura que requieren o no del procesamiento por el proteasoma. Se muestra el porcentaje relativo respecto de los que se conoce la participación del proteasoma, deducido de la sensibilidad de su presentación antigénica a inhibidores del mismo.

(Anderson y col. 1991; Hammond y col. 1993; Zweerink y col. 1993; Gueguen y col. 1994; Schirmbeck y Reimann 1994; Hammond y col. 1995; Elliott y col. 1995; Lee y col. 1996; Khanna y col. 1996; de la Salle y col. 1997; Snyder y col. 1997; Gil-Torregrosa y col. 1998; Wood y Elliott 1998; Snyder y col. 1998; Grommé y col. 1999; Sigal y Rock 2000; Wölfel y col. 2000; Neumeister y col. 2001; Paliard y col. 2001; Lautscham y col. 2001; Saulquin y col. 2001; Kuzushima y col. 2003; Lautscham y col. 2003b; Tiwari y col. 2007; Johnstone y col. 2008; El Hage y col. 2008; Oliveira y col. 2011).

2.1.3.4. Aminopeptidasas de RE asociadas al procesamiento de antígeno.

Comparado con el citosol, el RE presenta una baja actividad proteolítica. Además de las endoproteasas peptidasa señal (SP) y peptidasa del péptido señal (SPP), en el RE

hay aminopeptidasas residentes, que pueden eliminar residuos flanqueantes en el extremo amino del péptido antigénico.

Las aminopeptidasas del RE pertenecen al grupo de las metalopeptidasas que unen zinc. Esta subfamilia tiene 3 miembros en el ser humano que son relevantes para procesamiento antigénico: las enzimas ERAP1, ERAP2 e IRAP (aminopeptidasa regulada por insulina). En el ratón, ERAAP es el homólogo de ERAP1, mientras que ERAP2 no se expresa. Las enzimas ERAP son inducibles por IFN γ pero IRAP no. Estudios con digestiones *in vitro* revelan que ERAP1 recorta de forma óptima péptidos con una longitud entre 9 y 16 aa y los productos raramente tienen menos de 8 ó 9 aa, lo que sugiere que esta aminopeptidasa de RE ha evolucionado para generar péptidos del tamaño adecuado para la unión a moléculas de MHC de clase I (Serwold y col. 2002; Saric y col. 2002; York y col. 2002). En cuanto a su especificidad, ERAP1 prefiere residuos grandes e hidrofóbicos tanto en el extremo amino como en el carboxilo del precursor, mientras que aa cargados o pequeños e hidrofóbicos se recortan con muy baja eficiencia (Saveanu y col. 2005; Chang y col. 2005; Hearn y col. 2009). Esto es consistente con el tamaño y la especificidad de TAP para unir y translocar péptidos al RE así como con las especificidades de los alotipos de MHC de clase I para unir péptidos. Sin embargo, ERAP1 no puede recortar péptidos con el aa P en posición 2, de forma que estos péptidos se acumulan en el RE procedentes de precursores citosólicos más largos, explicando el uso preferente de P en 2 como motivo de anclaje de un porcentaje considerable de alotipos de MHC de clase I, a pesar de la incapacidad de TAP de transportar estos péptidos (Serwold y col. 2001). El recorte por ERAP1 está también influido por las posiciones internas 2, 5 y 7, con preferencia por aa hidrofóbicos o cargados positivamente (Evnouchidou y col. 2008).

La determinación de la estructura cristalográfica de ERAP1 (Kochan y col. 2011; Nguyen y col. 2011) sugiere cambios conformacionales que explicarían la baja especificidad de sustrato y la preferencia por sustratos largos. La estructura es más compatible con la hipótesis de considerar a ERAP1 como una “regla molecular” (Chang y col. 2005) que con el modelo alternativo que postulaba su acción enzimática sobre péptidos ya unidos al “molde” que proporcionaría la molécula de MHC de clase I (Kanaseki y col. 2006). El modelo del molde también había sido contradicho por experimentos de nuestro laboratorio con un péptido de 15 aa de HIV, que es un

precursor natural que se encuentra en células infectadas, y que se recorta por ERAP sólo en su forma libre y no cuando está unido a la molécula de MHC de clase I murina H-2L^d (Samino y col. 2006; Infantes y col. 2010).

Se han observado alteraciones en el repertorio de linfocitos T CD8⁺ del ratón deficiente en ERAP indicando que el recorte de los precursores opera ya durante la selección en el timo de los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, aunque este ratón tiene una reducción en la expresión de moléculas de MHC de clase I, en este estudio no se observó ningún efecto sobre la respuesta de linfocitos T CD8⁺ frente a distintos epítomos virales (Hammer y col. 2006). Diferentes estudios en cultivo utilizando ARN de interferencia han demostrado la contribución de ERAP1 tanto a la generación como a la destrucción de distintos epítomos para su presentación por MHC de clase I a CTL (Serwold y col. 2002; York y col. 2002). Se han descrito también evidencias de que la deficiencia en ERAP compromete la presentación cruzada de ciertos antígenos particulados (Yan y col. 2006; Firat y col. 2007).

ERAP2 prefiere sustratos con residuos básicos tanto en el extremo amino como carboxilo. Puede formar complejos diméricos con ERAP1 incrementando la eficacia de recorte de los precursores (Saveanu y col. 2005).

La importancia de ERAP en el procesamiento antigénico queda reflejada en la existencia de inhibidores en citomegalovirus (Kim y col. 2011). Además, se ha identificado una población de linfocitos T CD8⁺ que reconoce específicamente un péptido FL9 que sólo se genera cuando la actividad ERAAP está reprimida y que es presentado por la molécula de MHC no convencional Qa-1^b (Nagarajan y col. 2012).

Varios grupos han examinado la actividad proteolítica de recorte en el citosol y en el RE. Mediante un estudio bioinformático Schatz y col. han analizado la frecuencia de aa entre las posiciones N1 y N5, siendo N5 el residuo inicial del péptido extendido en amino, de los precursores de más de 1500 epítomos conocidos y han identificado la existencia de un “motivo de procesamiento amino terminal”. Los precursores extendidos en amino tienen aa como P o W en las posiciones N4-N5 que son recortados inicialmente en el citosol y entran al RE con extensiones de 1 a 3 aa como L o M o con aa básicos (en una baja representación), que serían eliminados por aminopeptidasas del RE. Las especificidades relajadas de corte de las aminopeptidasas citosólicas o del RE serían compatibles con este motivo de degradación amino terminal (Schatz y col. 2008).

2.1.4. Carboxipeptidasas de la vía secretoria asociadas al procesamiento de antígenos.

Hasta el año 2011 se había asumido que la actividad carboxipeptidasa en la vía secretoria era inexistente en células de rata (Powis y col. 1996) o muy deficiente (Snyder y col. 1998) o limitando unas 1000 veces la eficacia de generación de epítomos en células murinas y humanas (Medina y col. 2009).

Existían sin embargo en células murinas y humanas carentes de TAP evidencias claras del recorte del extremo carboxilo de péptidos naturales tanto derivados de secuencias señales (Henderson y col. 1992; Wei y Cresswell 1992) como de proteínas completas (Gil-Torregrosa y col. 1998). Finalmente, se ha descrito recientemente que la ACE puede generar el extremo carboxilo de epítomos desde péptidos procesados previamente por el proteasoma. La deficiencia de esta enzima en ratones genéticamente modificados genera un nuevo repertorio de epítomos propios, de forma que aparecen nuevos epítomos y se eliminan otros (Shen y col. 2011).

2.1.5. Endoproteasas vesiculares implicadas en procesamiento endógeno de antígenos.

En el apartado 2.1.2 describimos antígenos generados por vías citosólicas alternativas a la vía convencional de procesamiento de antígeno por MHC de clase I. Al contrario que el citosol o que los lisosomas, la vía secretoria y los compartimentos vesiculares son un medio menos degradativo. Sin embargo se han descrito distintas endoproteasas que participan en el procesamiento de antígenos de MHC de clase I (Tabla 1 y Figura 2).

La peptidasa señal es una enzima madurativa que reconoce y retira la secuencia señal de proteínas que entran co-traduccionamente en el RE. Ésta es una secuencia patrón que comienza en el extremo amino con 1 a 5 residuos básicos, un núcleo hidrofóbico de 7 a 15 aa, seguidos de 3 a 7 aa polares y que termina con residuos pequeños y no polares en el extremo carboxilo. Las secuencias señales cortadas son péptidos cortos que no necesitan de un gran recorte adicional para unirse a MHC de clase I. Se han descrito varios ejemplos de epítomos independientes de TAP generados

por esta enzima (Henderson y col. 1992; Wei y Cresswell 1992; Bell y col. 2009) aunque también destruidos (Schlosser y col. 2007).

En los estudios a gran escala del repertorio de ligandos de MHC de clase I realizado mediante técnicas de inmunoproteómica y espectrometría de masas con células no infectadas, se ha detectado que la secuencia señal es la principal fuente de ligandos independientes de TAP presentados por HLA-A2 y HLA-B51. El hecho de que HLA-A2 acomode bien una alanina en la posición carboxilo terminal explica que en la mayor parte de los epítomos presentados por esta molécula la peptidasa señal pueda generar el extremo carboxilo exacto del epítomo (Weinzierl y col. 2008). En otros alotipos de MHC de clase I, como K^d, HLA-B51 o de clase Ib como Q-a1^b, es necesario el recorte del epítomo tanto en el extremo amino como en el carboxilo (Suri y col. 2006; Weinzierl y col. 2008; Oliveira y col. 2009), implicando aminopeptidasas como ERAP y carboxipeptidasas como quizás ACE.

La peptidasa del péptido señal es otra endoproteasa del RE que corta en zonas TM de las proteínas y dentro de algunos péptidos señal. Está implicada en el procesamiento de un epítomo favoreciendo su presentación de forma dependiente de proteasoma y de TAP (Bland y col. 2003).

Dos proprotein convertasas localizadas en la red de trans Golgi, furina y proprotein convertasa PC7 se han implicado en el procesamiento de ciertos epítomos en la vía secretoria.

Furina es una proprotein convertasa residente en la red del trans Golgi que media en la maduración de muchas proproteínas como hormonas peptídicas o glicoproteínas virales. Esta enzima corta preferencialmente tras residuos polibásicos del sustrato, tiene especificidad por un motivo RXR/KR. La inhibición de esta proteasa con el inhibidor específico dec-RVKR-cmk, que imita los 4 aa del motivo de unión a la proteasa, inhibe de una forma dependiente de dosis la presentación a CTL del epítomo 9pp89 a partir de la construcción viral rVV-sC-A9A—en células deficientes en TAP T2L^d infectadas (Gil-Torregrosa y col. 1998; Gil-Torregrosa y col. 2000).

In vivo se ha descrito que la furina puede generar alrededor de un tercio de los complejos K^b/SIINFEKL en células TAP⁺ demostrando que contribuye a la presentación global de antígenos en presencia de TAP. Además se ha descrito que genera epítomos

que son reconocidos por linfocitos T CD8⁺ en ratones deficientes en TAP (Medina y col. 2009).

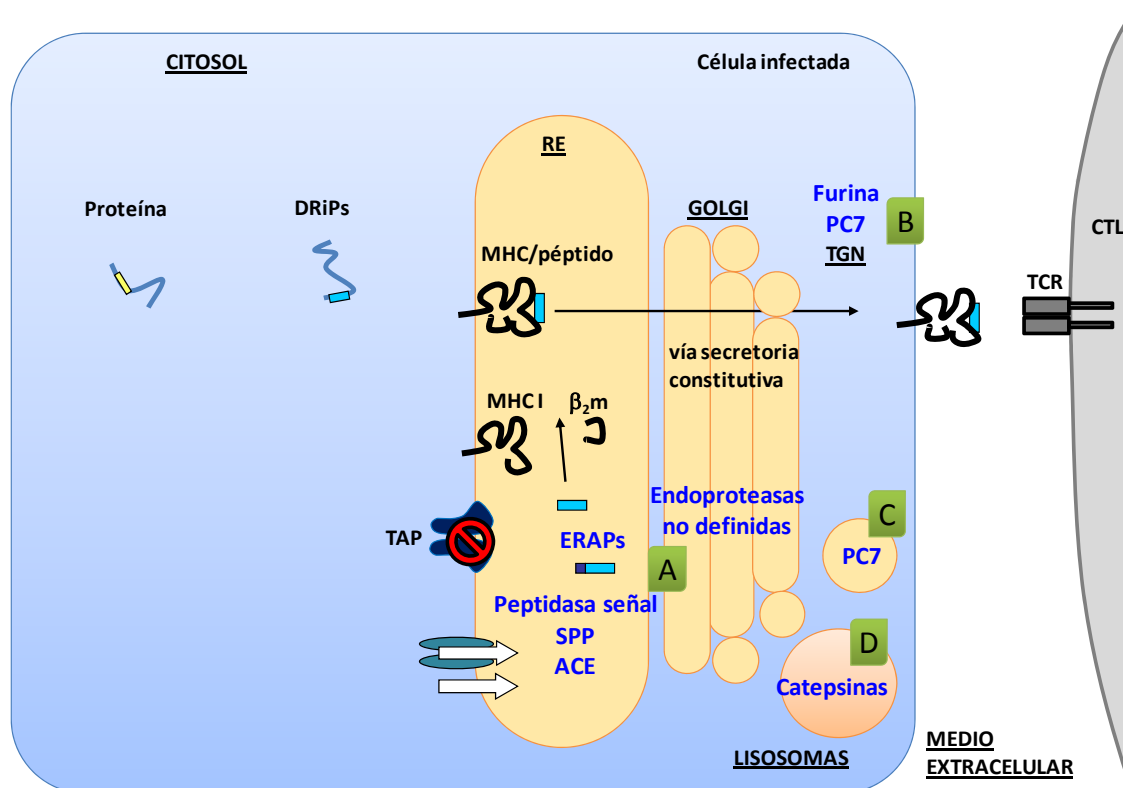


Figura 2. Endoproteasas vesiculares implicadas en el procesamiento de antígenos por MHC de clase I.

El procesamiento antigénico en el RE puede ser realizado por la peptidasa señal (SP), la peptidasa del péptido señal (SPP) o por otras endoproteasas de la vía secretoria no definidas (A). Dos proprotein convertasas pueden generar antígenos en ausencia de TAP: la furina localizada en la red del trans Golgi y la PC7 localizada además en vesículas endocíticas (B, C). Las catepsinas pueden participar en la generación de ligandos de MHC de clase I en compartimentos endolisosomales (D). La mayoría de los productos de estas endoproteasas requieren del recorte por aminopeptidasas como ERAP y por carboxipeptidasas como ACE. Las proteasas se indican en azul.

La PC7 es una serín-proteasa de amplia distribución tisular que típicamente corta sus sustratos en residuos de arginina. Se localiza en la red del trans Golgi y además en vesículas endocíticas. Se ha descrito que participa en la estabilización de moléculas de MHC de clase I inestables en la superficie celular en compartimentos posteriores al RE, aportando un segundo punto de control de calidad para la carga de nuevos péptidos sobre MHC (Leonhardt y col. 2010).

Las catepsinas son cisteín o aspártico-proteasas localizadas en compartimentos endolisosomales. Se han implicado, junto a la furina, en la generación a través de una ruta vacuolar independiente de TAP del epítipo SIINFEKL de Ova a partir de una proteína de fusión quimérica con la molécula de MHC de clase I K^b que se internaliza desde la superficie celular (Tiwari y col. 2007).

2.1.6. Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I.

Las proteínas de MHC de clase I están codificadas por genes situados en la región denominada complejo principal de histocompatibilidad. Los genes del MHC son los genes más polimórficos de los que se encuentran en el genoma de todas las especies de vertebrados superiores. En el ser humano, el MHC se denomina HLA (Antígeno leucocitario humano) y está localizado en el cromosoma 6. Los *loci* principales que codifican para moléculas de clase I se denominan HLA-A, -B y -C. En ratones el MHC se llama H-2 (histocompatibilidad-2, por estar cerca del denominado antígeno sanguíneo 2) y está en el cromosoma 17. Los *loci* murinos son K, D y L. El conjunto de alelos del MHC presentes en cada cromosoma se denomina haplotipo.

La molécula de MHC de clase I es un heterodímero compuesto por una cadena α o pesada que es una glicoproteína de membrana de unos 43 kD, codificada en el MHC, unida no covalentemente a una segunda cadena de 12 kD no codificada en el MHC llamada β 2m. La cadena α presenta tres dominios extracelulares; α 1, α 2 y α 3 seguidos de un dominio TM y una cola citoplásmica corta. Los dominios α 1 y α 2 forman juntos una cavidad hidrofóbica o surco de unión al péptido donde se concentran la mayor parte de los residuos polimórficos. El dominio α 3 interacciona con β 2m. La unión del péptido al surco de la molécula de MHC de clase I se produce mediante 2 tipos de interacciones débiles. Los extremos amino y carboxilo del péptido interaccionan con determinados residuos altamente conservados entre diferentes alotipos de MHC, por lo que el tamaño de los péptidos unidos suele ser similar, entre 8 y 10 aa. Además, en el surco de unión existen unas subcavidades formadas por zonas polimórficas específicas de cada alotipo, con las que interaccionan las cadenas laterales de los denominados residuos de anclaje del péptido. Como resultado, diferentes alotipos de MHC de clase I unen diferentes péptidos (Falk y col. 1991).

Se conocen los residuos de anclaje de los péptidos a los diferentes alotipos de MHC de clase I humanos y de ratón. Normalmente son dos residuos, situados en las posiciones 2-5 y en la última posición del péptido. En concreto, los motivos de anclaje preferenciales de las moléculas H-2 K^b y D^b se muestran en la Tabla 3. Esta información permite predecir en una determinada proteína posibles epítomos presentados por un alotipo de MHC de clase I a CTL para lo que existen múltiples algoritmos, entre ellos SYFPEITHI que mide el nivel de adecuación de un péptido a los motivos de anclaje consenso de las moléculas de MHC de clase I (www.syfpeithi.de) (Rammensee y col. 1999) y BIMAS que mide el tiempo medio de disociación de los complejos MHC:péptido (www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) (Parker y col. 1994). Excepcionalmente, las moléculas de MHC de clase I unen péptidos más largos, usualmente anclados en los extremos amino y carboxilo pero sobresaliendo en la zona central (Burrows y col. 2007), o bien con residuos protuberantes en amino (Samino y col. 2006) o en carboxilo (Collins y col. 1994). Este tipo de epítomos no son predichos por estos algoritmos.

	Posición								
H-2K ^b	1	2	<u>3</u>	4	5	6	7	8	9
			<u>Y</u>		F			L	
					Y			M	
								I	
								V	
H-2D ^b	1	2	3	4	5	6	7	8	9
					N				M
									I
									L

Tabla 3. Motivos principales (negrita) o auxiliares (subrayado) de anclaje de los péptidos a las moléculas de MHC de clase I, H-2 K^b y D^b.

2.1.7. El complejo de carga.

La interacción entre la molécula de clase I y el péptido debe ser muy estable. El papel del complejo de carga es favorecer los complejos óptimos y más estables. El complejo de carga está compuesto por TAP, la tapasina, la molécula de MHC de clase I, la calreticulina (lectina dependiente de calcio) y la oxidoreductasa ERp57. El intercambio de péptidos de baja afinidad por péptidos de alta afinidad es promovido por este complejo proteico, de forma que aquellos péptidos que cumplen los requisitos se unen al surco principal de las moléculas de MHC formando un complejo heterotrimérico estable junto a la proteína $\beta 2m$. Los complejos estables MHC/péptido salen del RE hacia la superficie celular por la vía secretoria.

En la mayoría de los casos, la presentación de los epítomos independientes de TAP es sensible a brefeldina A, BFA, inhibidor del transporte anterógrado en la vía secretoria endógena (Lippincott-Schwartz y col. 1990). Esto se debe a que el sitio canónico para la unión de los epítomos a las moléculas de MHC de clase I es el RE. Sin embargo la presentación independiente de TAP de antígenos que son liberados por proteasas de compartimentos endosomales, sugiere que la carga de MHC de clase I con péptido podría darse en estos compartimentos, donde ocurre el reciclaje de moléculas de MHC de clase I (Schirmbeck y Reimann 2002; Tiwari y col. 2007).

2.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS LIGANDOS DE MHC DE CLASE I INDEPENDIENTES DE TAP.

Recientemente se han realizado estudios a gran escala en células deficientes en TAP no infectadas en los que se han aislado los péptidos presentados por 3 moléculas de MHC clásicas, H-2K^d, HLA-A2 y HLA-B51, y una molécula no clásica, Qa-1^b. A partir del análisis de los péptidos encontrados se han sugerido una serie de características sobre los epítomos independientes de TAP que los diferencian de los clásicos y que se resumen en la Tabla 4 (Del Val y col. 2011).

1. Se adaptan menos a los motivos de unión a MHC de clase I
2. Algunos son ligeramente más largos y tienen una afinidad de unión a MHC más baja
3. Derivan de proteínas de membrana y secretadas
4. Inesperadamente, muchos de ellos derivan de proteínas citosólicas y nucleares
5. Parte de ellos, en un número muy variable según el haplotipo, derivan de la secuencia señal
6. Se benefician también del recorte en el extremo amino
7. Es muy frecuente el recorte en el extremo carboxilo
8. Algunos son el extremo carboxilo exacto de la proteína

Tabla 4. Características de los ligandos de MHC de clase I producidos en ausencia de TAP en comparación con los dependientes de TAP.

(Del Val y col. 2011).

El porcentaje de ligandos independientes de TAP que derivan del dominio luminal o TM de proteínas parentales de membrana es variable y representa desde el 10 al 70% dependiendo del alotipo de MHC de clase I. Es decir, para algunos alotipos existe una fracción alta (del 90 al 30%) de ligandos que derivan de proteínas citosólicas, nucleares, mitocondriales o del dominio citosólico de proteínas de membrana (Figura 3a). Cuando se compilan los 4 alotipos estudiados, el 75% de los ligandos independientes de TAP derivan de proteínas citosólicas (Figura 3b). En la Figura 3c se muestra que la mayoría de los ligandos luminales o TM (el 90%) derivan de glicoproteínas de tipo I, siendo variable la fracción de epítomos que derivan de la secuencia señal de la proteína parental (20% para K^d, 25% para Qa-1^b, 80% para HLA-B51 y 90% para HLA-A2). La peptidasa señal puede generar el extremo carboxilo exacto de aproximadamente la mitad de los ligandos (todos presentados por HLA-A2), pero muchos requieren de un recorte carboxilo terminal y casi todos requieren de recorte amino. Globalmente el 43% (3/7) de los ligandos derivados de proteínas con regiones TM se localizan parcial o totalmente en regiones TM. Este porcentaje baja al 7% (3/44) si consideramos todas las proteínas con acceso a membrana (Figura 3c, d).

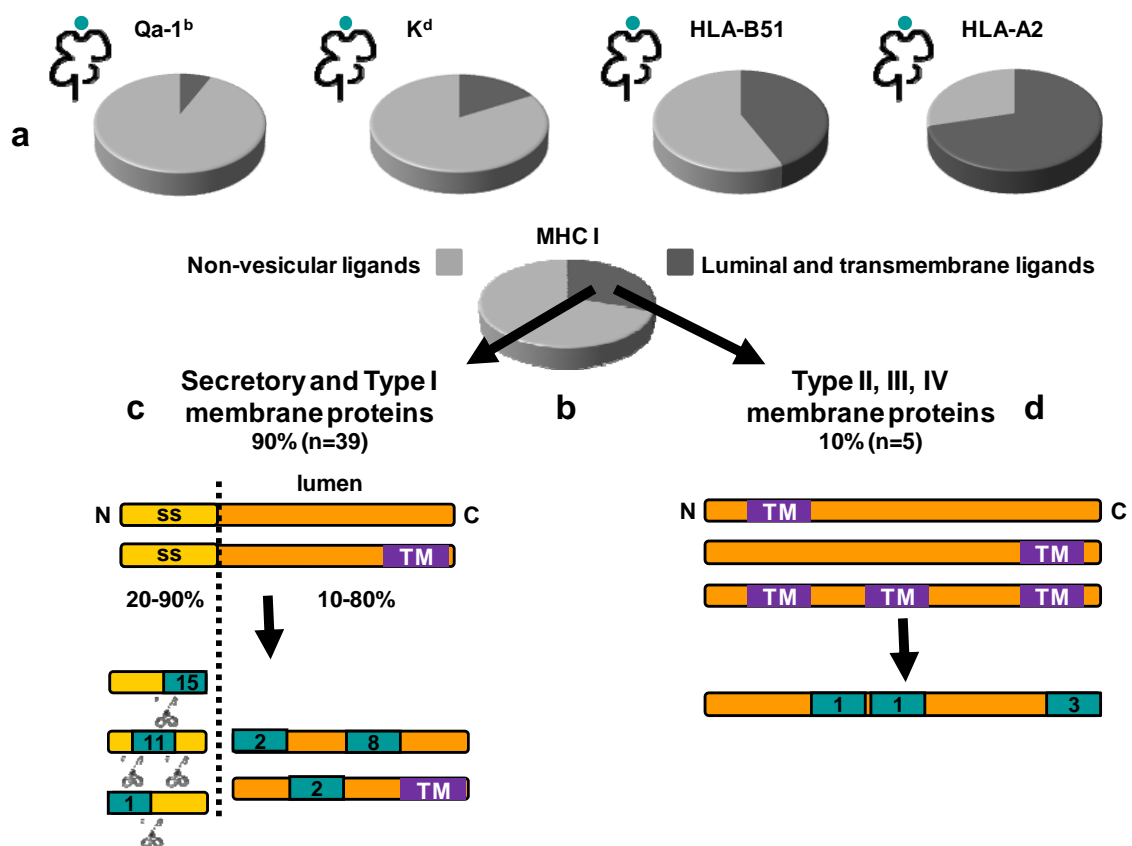


Figura 3. Características de los ligandos de MHC de clase I generados en las vías secretorias y vesiculares e identificados en los estudios a gran escala.

(a) Fracción de ligandos derivados de regiones luminales o TM de la proteína parental (gris oscuro) respecto a la fracción de ligandos derivados de la región no vesicular (citósol, nuclear, mitocondrial) para los 4 alotipos de MHC de clase I indicados. (b) Análisis global de los ligandos luminales o no vesiculares mostrados en a. Fracción de epítomos que derivan de las distintas regiones de la proteínas de tipo I (c) y de tipos II, III y IV (d). La línea discontinua representa el corte por la peptidasa señal y las tijeras el recorte por exopeptidasas. Los ligandos se representan como rectángulos verdes y en su interior se indica el número de ligandos encontrados de ese tipo. (d) De los 3 ligandos que coinciden con el extremo carboxilo, 2 se encuentran en la región TM y 1 en la región citosólica de la proteína parental (Suri y col. 2006; Weinzierl y col. 2008; Oliveira y col. 2009). Adaptado de (Del Val y col. 2011).

2.3. ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD8⁺.

Las células dendríticas (DC) migratorias muestrean los tejidos periféricos capturando antígenos potenciales y migran hacia los ganglios linfáticos donde se encuentran con los linfocitos T CD8⁺ vírgenes. En los ganglios linfáticos existen DC residentes que son especialistas en presentar antígeno y activar linfocitos T CD8⁺ vírgenes (Croizat y col. 2010). Estas APC profesionales presentan el epítipo viral unido a

la molécula de MHC de clase I en superficie, que interacciona con el TCR de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes dando lugar a la activación de los mismos (*"priming"*), siempre que haya además coestimulación mediada por la interacción de ciertas proteínas de las DC y sus correspondientes ligandos en los linfocitos T.

Cuando el epítipo viral presentado resulta del procesamiento endógeno del antígeno viral sintetizado en la propia DC infectada hablamos de presentación directa. Por otro parte, las DC convencionales que también expresan CD8 son especialistas en incorporar antígenos de los restos de células infectadas circundantes o captar antígenos transferidos por las DC migratorias e introducirlos en su vía de procesamiento endógena para su presentación por MHC de clase I, mecanismo que se conoce como presentación cruzada (*"cross-presentation"*). La estimulación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes por APC profesionales mediante presentación cruzada se denomina activación cruzada (*"cross-priming"*). La presentación cruzada tiene relevancia fisiológica en circunstancias en las que por ejemplo un virus no infecta APC (Haeryfar y col. 2005; Yewdell 2010).

Recientemente se ha demostrado que la presentación directa de antígenos es suficiente para la activación de linfocitos T CD8⁺ anti-VACV (Xu y col. 2010), aunque para una cepa no replicativa de VACV, MVA, se ha sugerido que sólo existe presentación cruzada (Gasteiger y col. 2007). Las DC infectadas expresan genes de VACV tempranos y tardíos (Moutaftsi y col. 2009); sin embargo, mientras que las DC presentan de forma directa y cruzada los epítopos derivados de proteínas tempranas, se ha sugerido que los epítopos tardíos no se presentarían de forma directa y sólo aquellos que se localizan fuera de las factorías virales se presentarían de forma cruzada a linfocitos T CD8⁺ (Tewalt y col. 2009).

Tras su activación, ya sea directa o cruzada, los linfocitos T CD8⁺ estimulados sufren una expansión clonal generándose un elevado número de CTL efectores que salen del ganglio linfático y migran hacia el sitio de infección donde eliminan las células infectadas. Los CTL activados inducen la apoptosis en las células infectadas diana por dos mecanismos citotóxicos; una vía implica la liberación de gránulos secretorios induciendo la formación de poros en la membrana de la célula diana por acción de la proteína perforina, y la entrada de unas serínproteasas llamadas granzimas, que inducen la apoptosis en la célula infectada. La otra vía citotóxica depende de la interacción entre el ligando de Fas (FasL) que existe en la superficie del CTL y el receptor

Fas presente en la superficie de la célula infectada presentadora. Tras eliminar las células infectadas, se reduce sustancialmente el número de CTL activados que mueren por apoptosis. Algunos CTL activados no se diferencian terminalmente a CTL efectores, sino que gradualmente derivan a CTL de memoria, y son responsables de una respuesta más rápida y efectiva en el caso de una infección secundaria.

2.4. EL VIRUS VACCINIA.

2.4.1. El ciclo replicativo del virus.

El origen de VACV es aún desconocido pero es el virus prototipo de laboratorio para estudiar los poxvirus como el de la viruela y es el agente utilizado como vacuna para la erradicación de la viruela humana durante la década de 1970. VACV es un miembro del género Orthopoxvirus de la familia Poxviridae que posee un genoma de ADN de doble cadena con aproximadamente 200.000 pares de bases que codifican más de 200 proteínas. VACV realiza su ciclo infectivo en el citosol, y la progenie viral se agrupa en la fase tardía de la infección en los sitios denominados factorías virales. Las factorías virales se descubrieron mediante microscopía electrónica por primera vez en 1961 (Dales y SIMINOVITCH 1961), abriéndose un gran campo de estudio. En los últimos 10 años se ha descrito en profundidad su organización funcional y su composición proteica (Tolonen y col. 2001; Moss 2006; Katsafanas y Moss 2007). Las factorías virales son áreas citoplasmáticas densas que comienzan con una membrana en forma de media luna creciente hasta formar una estructura esférica rodeada de membrana donde los orgánulos celulares están excluidos. Varios estudios sugieren que esta membrana deriva de componentes del RE (Husain y col. 2006; Husain y col. 2007).

VACV da lugar a dos tipos de viriones infecciosos: el IMV (virus maduro intracelular) está rodeado por una membrana y se mantiene en el interior celular hasta la lisis de la célula. El otro tipo de virión está rodeado por una doble membrana y es exportado por gemación desde la célula antes de la muerte celular. Este segundo tipo agrupa a los CEV (virus envueltos asociados a la célula), que permanecen asociados a la superficie celular facilitando la diseminación entre células vecinas, y los EEV (virus envueltos extracelulares), que median la diseminación a medio-largo alcance y son

especialmente relevantes en la diseminación in vivo. El IMV es más susceptible a anticuerpos neutralizantes y al complemento.

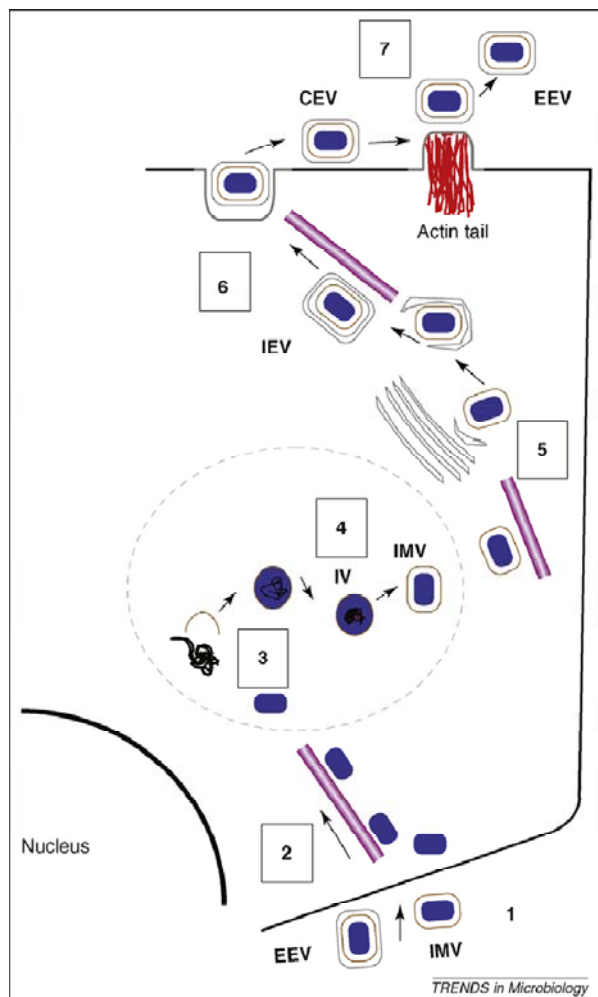


Figura 4. Ciclo replicativo de VACV.

El virus entra por endocitosis (preferencialmente en el caso de la cepa WR) o por fusión con la célula y se libera el núcleo viral sin membrana en el citoplasma (1).

El núcleo viral es transportado por microtúbulos al interior del citoplasma (2). Transcripción de los ARNm tempranos y replicación del ADN (3).

Emsamblaje de los IV dentro de la factoría viral y maduración a IMV, con una membrana (4).

La mayoría de los IMV son liberados por lisis celular (5).

Algunos IMV son envueltos por una doble membrana para formar IEV, con tres membranas, que son transportados a la superficie celular por microtúbulos (6).

La membrana externa de los IEV fusiona con la membrana plasmática y se expone el CEV, con dos membranas, en la superficie celular. La polimerización de tallos de actina bajo la superficie celular impulsa la liberación de los CEV en forma de EEV hacia células vecinas (7).

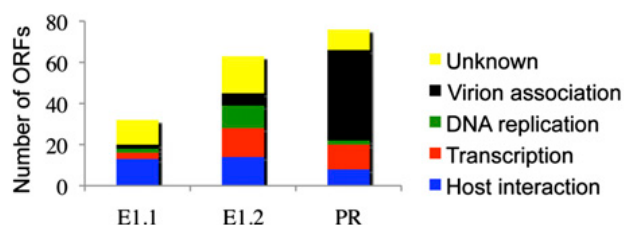
(Roberts y Smith 2008).

IV: Virión inmaduro, IMV: Virión maduro intracelular, IEV: Virión envuelto intracelular, CEV: Virión envuelto asociado a la célula, EEV: Virión envuelto extracelular

El ciclo de replicación viral de VACV (Figura 4) comienza con la unión a la célula del CEV o EEV, la eliminación de la membrana y la fusión directa a la membrana celular. El IMV, tras la unión, puede entrar en la célula de dos formas: mediante fusión directa con la membrana celular o por endocitosis. El nucleoide o core es transportado por microtúbulos hacia la región perinuclear de la célula y contiene el ADN compactado y las enzimas necesarias para comenzar la replicación del ADN y la transcripción de los genes tempranos (Figura 4). Tras la desencapsidación, la replicación del ADN comienza de

forma temprana unas horas después de la infección y es seguida de la expresión génica tardía.

A



B

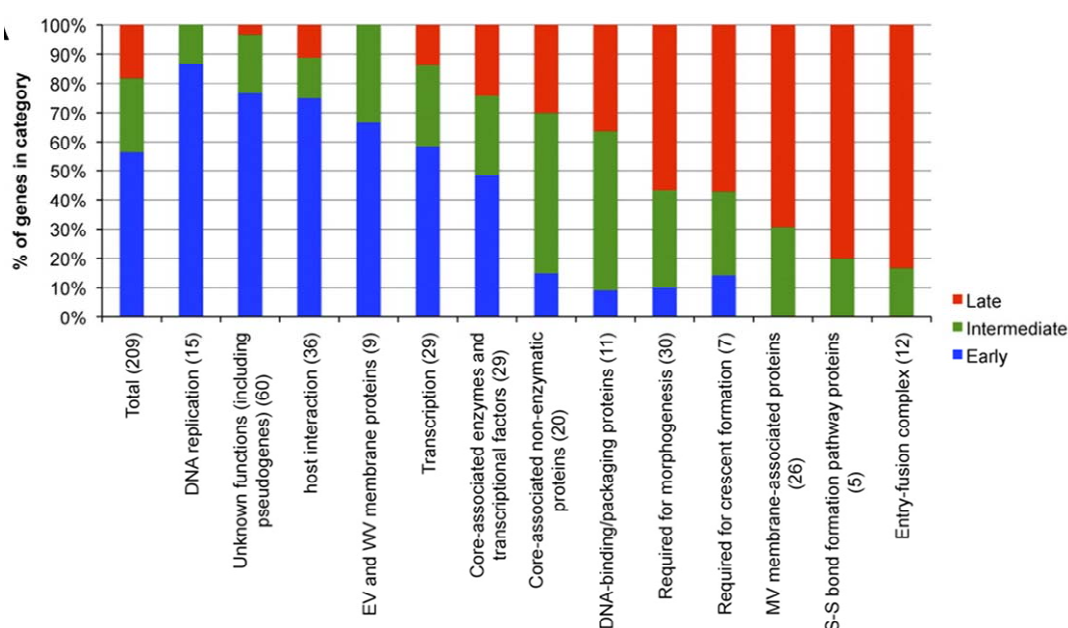


Figura 5. Categoría funcional y temporal de los genes de VACV.

A) Se muestra el número de genes de VACV asociados a una función específica que pertenecen a cada categoría temporal descrita (Yang y col. 2010). B) Se muestra la fracción de genes de VACV de cada categoría funcional y su expresión temporal (Yang y col. 2011). Las categorías temporales E1.1 y E1.2 de A se engloban en la categoría “early” de B. La categoría PR (post-replicativa) de A engloba a las categorías “intermediate” y “late” de B. Las categorías funcionales “Transcription” y “DNA replication” se engloban más adelante en la categoría “regulación viral”.

La expresión génica en cascada se ha clasificado y subclasificado de diversas maneras, y recientemente se han agrupado en 3 categorías temporales: tempranos, intermedios y tardíos (Yang y col. 2011), estas dos últimas se incluían en la categoría de post-replicativos anteriormente descrita por el mismo grupo (Yang y col. 2010). El 50 % de los genes de VACV son tempranos y la mayoría de las proteínas expresadas son

factores de interacción con el huésped y proteínas que participan en la replicación del ADN y en la transcripción. Los genes intermedios y tardíos codifican principalmente proteínas y enzimas que participan en el ensamblaje de los viriones (Figura 5). Estos viriones intracelulares (IMV) rodeados por una membrana son transportados hasta la superficie celular donde pueden quedar asociados, CEV, o liberarse al medio extracelular en forma de EEV (Figura 4) (Condit y col. 2006; Roberts y Smith 2008). El VACV produce bajos niveles de EEV y en concreto en la cepa WR (Western Reserve) utilizada en este trabajo la mayoría de las partículas permanecen asociadas a la célula en la forma CEV (Payne 1980).

2.4.2. Respuesta inmune frente a VACV.

En la respuesta inmune frente a VACV existen componentes del sistema innato y del adaptativo. Muchos tipos de células del sistema inmune innato se infiltran en los tejidos tras la infección por VACV. Estas poblaciones incluyen macrófagos, monocitos, neutrófilos o células NK (*natural killer*), todos los cuales tienen diversas maneras de combatir el virus. En concreto, los macrófagos y los neutrófilos actúan en la respuesta primaria frente a VACV fagocitando las partículas virales en los fagolisosomas y liberando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que las inactivan. La infección por VACV es abortiva en macrófagos y aún no está claro su papel en la eliminación del virus *in vivo*. Los IFNs de tipo I son importantes para la respuesta innata frente a VACV. Sin embargo, la respuesta innata es sólo efectiva frente a los viriones extracelulares, así que son necesarias otras estrategias inmunes que eliminen la infección, ya que VACV puede pasar directamente de célula a célula sin necesidad de exponerse al medio extracelular (Moss 2006).

El IFN γ presenta una actividad antiviral ya que la infección de ratones con un rVACV que expresa IFN γ resulta en una rápida eliminación del virus (Kohonen-Corish y col. 1990). La proteína B8 de VACV codifica el receptor soluble de IFN γ pero éste presenta una baja afinidad por el IFN murino, lo que explicaría que el VACV que carece de B8 presente una virulencia similar en el ratón que el virus silvestre (Verardi y col. 2001)

La respuesta humoral de anticuerpos es un componente importante en la respuesta antiviral frente a VACV. Para una protección óptima por anticuerpos es necesario generar anticuerpos frente a las distintas formas víricas de VACV (Xu y col. 2004; Mota y col. 2011).

La respuesta celular esta mediada por linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Tanto los linfocitos T $CD4^+$ como los T $CD8^+$ requieren para su diferenciación a linfocitos efectores del reconocimiento de complejos MHC-péptido en la superficie de las APC profesionales. Tras la infección por VACV se acumulan localmente una gran cantidad de linfocitos T $CD4^+$ pero no parecen tener una actividad antiviral a pesar de ser una fuente importante de IFN γ , que más bien participa en la activación de células del sistema innato y de linfocitos T $CD8^+$ (Xu y col. 2004). Tras la infección, se produce una gran expansión de linfocitos T $CD8^+$ anti-VACV. Los esplenocitos obtenidos *ex vivo* de un ratón inmunizado con VACV contienen CTL específicos $CD8^+$ y lisan células infectadas *in vitro* con el virus.

Existe una gran cantidad de grupos, entre ellos el nuestro, interesados en el estudio de los mecanismos de presentación antigénica a linfocitos T $CD8^+$ y la respuesta inmune frente a virus (Fischer y Norbury 2007).

2.4.3. Epítomos de VACV presentados por MHC de clase I a linfocitos T $CD8^+$.

Los linfocitos T $CD8^+$ de memoria pueden proteger frente a la infección por VACV, pero en una respuesta primaria parece que no son necesarios, siendo los linfocitos T $CD4^+$ y los anticuerpos los que consiguen eliminar el virus (Xu y col. 2004).

Sin embargo, el estudio de esta respuesta inmune de CTL estaba dificultado por el desconocimiento de los epítomos que reconocían. Una amplia variedad de técnicas han sido utilizadas por diferentes grupos de investigación con el objetivo de identificar epítomos que se presentan a linfocitos T $CD8^+$. Estas técnicas incluyen la predicción de epítomos basándose en algoritmos, cromatografía y espectrometría de masas, librerías de péptidos, estrategias de clonaje y expresión génica, etc. Dado el gran polimorfismo del MHC, se han identificado epítomos de VACV presentados por distintos alotipos utilizando diferentes líneas celulares humanas o diferentes cepas de ratón.

Hasta la fecha se ha conseguido identificar más de 200 determinantes antigénicos para los linfocitos T $CD8^+$ en el contexto de 7 alotipos diferentes de HLA (Oseroff y col.

2005; Pasquetto y col. 2005; Terajima y col. 2006) y 5 alotipos murinos. En la cepa BALB/c se han descrito 54 determinantes presentados por las moléculas H-2 K^d, L^d y D^d (Tschärke y col. 2006; Oseroff y col. 2008). En el contexto murino de H-2K^b y D^b se han descrito recientemente 49 determinantes antigénicos para los linfocitos T CD8⁺ (Tschärke y col. 2005; Moutaftsi y col. 2006) y en este trabajo se han utilizado 30 de los 49. Estos 30 epítomos derivan de 27 proteínas que constituyen un subconjunto representativo de las proteínas totales de VACV. Se han descrito 9 proteínas de VACV que son inmunoprevalentes, es decir, que contienen epítomos presentados por varios alotipos de H-2 o de HLA, de las que hemos analizado en este trabajo 5.

2.4.4. Los VACV recombinantes (rVACV) en el estudio de la respuesta inmune celular y como vector vacunal.

VACV posee un gran genoma que permite albergar insertos grandes de ADN foráneo manteniendo su infectividad. Su ciclo replicativo facilita el procesamiento y presentación al sistema inmune de las proteínas de interés. Los rVACV tienen una alta capacidad para infectar un elevado número de tipos celulares y alcanzar niveles elevados de síntesis proteica. Además permite que ocurran modificaciones post-traduccionales, procesamiento, secreción y transporte acordes con la estructura primaria de la proteína expresada y el tipo celular (Moss 1996; Moss 2006). Los rVACV permiten estudiar la respuesta inmune y la protección frente a distintos agentes infecciosos, por lo que se han utilizado ampliamente para inducir CTL específicos en animales y para generar dianas reconocidas por CTL *in vitro*. En etapas tardías de la infección por VACV aparecen los mayores efectos citopáticos, y se asume que en general disminuye la presentación de antígenos por MHC de clase I y la presentación directa de algunos epítomos tardíos está bloqueada (Coupar y col. 1986; Tewalt y col. 2009), por lo que se recomienda el uso de promotores tempranos o tempranos/tardíos para la inducción de CTL o preparación de dianas para CTL.

Estudios *in vivo* con animales infectados con rVACV permiten determinar la respuesta celular o humoral a proteínas específicas. Existe un gran número de ejemplos en los que la inmunización de animales con rVACV que expresan antígenos tumorales o de otros patógenos virales ha proporcionado una protección total o parcial contra el

tumor o la infección por lo que podrían utilizarse como agentes de inmunoterapia en cáncer o como vacunas vivas. La seguridad en humanos se ha abordado desarrollando vectores de infectividad atenuada (Garcia-Arriaza y col. 2011) o muy restringida a ciertos tipos celulares o ciertas especies. Entre las posibles dificultades hay que tener en cuenta el problema de la eficacia debido a la existencia de una población previamente inmunizada frente a la viruela (Ramírez y col. 2000; Fischer y Norbury 2007). Además se ha observado que la proporción de linfocitos T CD8⁺ (y de otros agentes inmunes) frente a los antígenos propios de VACV es mayor que la que se produce frente a los antígenos recombinantes.

3. OBJETIVOS

Con el fin de estudiar la contribución de las **vías alternativas de presentación antigénica** por las moléculas de MHC de clase I a la respuesta de linfocitos T CD8⁺ antivirales, analizamos la presentación de antígenos de VACV en el modelo de ratón C57BL/6. Nos planteamos los siguientes objetivos:

- Identificar la respuesta inmune específica de **linfocitos T CD8⁺ de ratones deficientes en TAP** frente a antígenos de VACV.
- **Cuantificar *ex vivo* la presentación independiente de TAP** de antígenos de VACV a linfocitos T CD8⁺ de ratones C57BL/6.
- Analizar *ex vivo* la activación de linfocitos T CD8⁺ de ratones silvestres o deficientes en TAP por **30 epítomos de VACV**.
- Generar *in vitro* **líneas de CTL** policlonales y específicas para cada uno de los **30 epítomos de VACV** analizados y estudiar el reconocimiento de **células dendríticas infectadas**, todo ello en contexto silvestre y deficiente en TAP.
- Estudiar la **contribución global del proteasoma y de la TPPII** en el procesamiento de antígenos de VACV para su presentación a linfocitos T CD8⁺ de ratones C57BL/6.
- Estudiar la **contribución del proteasoma y otras proteasas** en el procesamiento de **epítomos individuales de VACV**, especialmente de los que se presentan de forma independiente de TAP.
- Estudiar la **protección frente a la infección por VACV en los ratones deficientes en TAP**.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS

4.1.1. Medios de cultivo

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco (Biowhittaker) suplementado con glutamina (Biowhittaker) 4 mM y suero bovino fetal (SBF) al 10%.

RPMI 1640: medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (Biowhittaker) suplementado con glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol (Merck) 5×10^{-5} M, y SBF al 10% para el cultivo de líneas celulares o SBF al 5% inactivado para ensayos funcionales.

α -MEM: medio esencial mínimo α (Gibco) suplementado con glutamina 8 mM, β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M, penicilina (Biowhittaker) 100 U/mL, estreptomicina (Biowhittaker) 100 U/mL, kanamicina (Sigma) 10 μ g/mL, anfotericina (Sigma) 2,5 μ g/mL, y SBF inactivado al 10%.

Tripsina-EDTA: tripsina (Biowhittaker), 0,25% EDTA (Merck) al 0,02% (p/v) en PBS. Se utilizó para subcultivar las células adherentes.

PBS: solución salina tamponada con fosfato: NaCl 137 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 2,7 mM.

4.1.2. Productos químicos.

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos (metanol, etanol, etc.) fueron suministrados en su mayoría por Merck, así como la sacarosa y la seroalbúmina bovina (fracción V).

El paraformaldehído fue suministrado por Electron Microscopy Sciences.

Sigma fue el proveedor del dimetilsulfóxido, el β -mercaptoetanol, el cristal violeta y la brefeldina A (BFA).

En los ensayos de citotoxicidad se utilizó $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ suministrado por Amersham Pharmacia Biotech.

Se utilizaron distintos inhibidores de proteasas: los inhibidores del proteasoma, lactacistina (LC) y epoxomicina, fueron suministrados respectivamente por E. J. Corey (Harvard University, Cambridge, MA, EE.UU.) y por Calbiochem; el leucintiol, que inhibe metalo-aminopeptidasas (sobre todo de tipo microsomal) (Weiss y col. 1988; Serwold y col. 2001), y la decanoil-peptidil-clorometilcetona (decRVKR-cmk), que inhibe específicamente a la endoproteasa furina localizada en el trans Golgi y a otras protein-convertasas de la misma familia (Stieneke-Grober y col. 1992), fueron suministrados por Bachem.

Inhibidor	Concentración en uso	Inhibe	Reversibilidad
BFA	10 μ M	Tránsito por el aparato de Golgi	Reversible
LC	10 μ M	Proteasoma (menos la actividad de caspasa)	Irreversible
Epoxomicina	1-2 μ M	Proteasoma (principalmente actividad quimiotrítica)	Irreversible
Leucintiol	30 μ M	Metallo-aminopeptidasas (sobre todo microsomales)	Reversible
decRVKR-cmk	50 μ M	Proteín convertasas	Irreversible

Tabla 5. Inhibidores utilizados en esta tesis.

Se indica la concentración en uso durante las infecciones virales, el proceso o proteasa que inhiben y su reversibilidad.

La interleuquina 2 (IL-2) recombinante humana fue generosamente suministrada por el NCI Preclinical Repository de los National Institutes of Health de EE.UU.

El kit IntraStain para citometría (Dako) contiene un reactivo A fijador y un reactivo B permeabilizador. Como alternativa utilizamos una solución fijadora que contiene PBS con paraformaldehído al 4% y una solución permeabilizante que contiene PBS con paraformaldehído al 4%, saponina al 0,1% y seroalbúmina bovina al 1%.

El yoduro de propidio, fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos y permite distinguir células permeables al paso de moléculas, fue suministrado por BD Pharmingen.

El factor estimulador de macrófagos y granulocitos, GM-CSF, de Peprotech, se utilizó para diferenciar en cultivo los precursores de la médula ósea a DC inmaduras.

4.1.3. Productos inmunoquímicos.

El anticuerpo monoclonal (mAb) de rata conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD8 α murino (clón KT15) fue proporcionado por Proimmune. Se utilizó en el ensayo de tinción intracelular de citoquinas (ICS) diluido 1/300.

El mAb de rata conjugado con Alexa Fluor 647 anti-CD3 murino (clon 17A2) y el mAb de rata conjugado con ficoeritrina anti-IFN γ murino (clon XMG1.2) fueron suministrados por Becton Dickinson. Se utilizaron en el ensayo de ICS diluidos 1/300 o 1/200 respectivamente.

Los linfocitos T CD8⁺ se purificaron a partir de esplenocitos por selección negativa con el kit II de aislamiento de células T citotóxicas CD8 α ⁺ murinas (MACS, Miltenyi Biotech).

4.1.4. Péptidos.

Los péptidos fueron sintetizados en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems (modelo 433A) y purificados. La identidad se confirmó mediante espectrometría de masas en un equipo de MALDI-TOF de Brücker Daltonics (modelo REFLEX) por el Dr. D. López (Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid). Se comprobó la homogeneidad de todos los péptidos mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa en un equipo BIOCAD (Applera).

El epítipo F85-93, de secuencia KYKNAVTEL, procede de los aa 85-93 de la proteína F de la cepa Long del virus respiratorio sincitial (RSV) y se presenta por H-2K^d murino (Chang y col. 2001).

Los péptidos sintéticos de VACV se corresponden con la secuencia descrita del correspondiente epítipo viral (Moutaftsi y col. 2006). Se nombraron indicando el nombre del gen de origen. Cuando se analizaron varios epítipos contenidos en la misma proteína se indica con un número la posición del primer aa del péptido en la secuencia de la proteína. Se emplea el código de una letra para los aa. Las características de los epítipos y de las proteínas de las que derivan se resumen en la Tabla 22 y en la Tabla 23.

El epítipo SIINFEKL deriva de los aa 257-264 de Ova.

4.1.5. Líneas celulares y células primarias.

Células 293L^d, 293K^d y 293K^b: fibroblastos embrionarios humanos derivados de la línea celular HEK 293 transfectados con los alelos de MHC de clase I murinos L^d, K^d y K^b respectivamente y tratados con geneticina. Fueron cedidos por el Dr. J. W. Yewdell y el Dr. D. C. Tschärke (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU.). Son adherentes y se cultivaron en DMEM.

Células HeLaK^d: células de adenocarcinoma epitelial humano transfectadas con el alelo de MHC de clase I murino K^d y tratadas con geneticina. Fueron cedidas por el Dr. J. W. Yewdell. Son adherentes y se cultivaron en DMEM.

Células CV1: fibroblastos adherentes de riñón de mono verde africano (ATCC: CCL-70). Son adherentes y se cultivaron en DMEM.

Células MEFs: fibroblastos embrionarios de ratón C57BL/6. Son adherentes y se cultivaron en DMEM.

Células dendríticas murinas derivadas de medula ósea (BMDC): se generaron a partir de precursores procedentes de la médula ósea extraída de los fémures de ratones sanos. Se crecieron en medio RPMI al 10% de SBF suplementado con antibióticos y con 200 U/mL de GM-CSF, que se reañadió tras 3 y 6 días de cultivo. A día 7 se recogieron las células no adherentes (Lutz y col. 1999; Medina y col. 2009). La maduración de las BMDC se realizó mediante la adición de 0,5 µg/mL de lipopolisacárido bacteriano (LPS) a día 7 de cultivo. Las BMDC generadas con GM-CSF son fenotípicamente similares a las DC inflamatorias que se diferencian *in vivo* a partir de monocitos reclutados en el sitio de inflamación o de infección. Son células fáciles y reproducibles de obtener y se usan ampliamente en estudios de presentación de antígeno.

Todas las células se crecieron a 37°C en una atmósfera con 98% de humedad. Las células cultivadas en RPMI 1640 se crecieron en una atmósfera con 5% de CO₂, mientras que las células cultivadas en otros medios de cultivo se crecieron en una atmósfera con 9% de CO₂.

Las células adherentes se subcultivaron desprendiéndolas con una solución de tripsina-verseno tras lavar con PBS.

Para almacenarlas, las células se resuspendieron en SBF con un 10% de dimetilsulfóxido y se congelaron en nitrógeno líquido.

Todas las células estaban libres de micoplasmas. Se realizaron controles regulares de ausencia de micoplasmas por reacción en cadena de la polimerasa, PCR.

4.1.6. Virus vaccinia.

Los virus utilizados en esta tesis se resumen en la Tabla 21.

4.2. PERMEABILIZACIÓN REVERSIBLE DE CÉLULAS CON ESTREPTOLISINA O Y SAPONINA.

La estreptolisina O (SLO) es una toxina producida por la bacteria *Streptococcus pyogenes*. Es una proteína de 69 kD con capacidad de generar poros en la membrana de las células sobre las que actúa de forma reversible. El poro creado permite el paso de moléculas de hasta 100 kD hacia el interior del citosol. La permeabilización con SLO de las células adherentes se realizó mediante incubación a distintos tiempos a 37°C en un tampón de permeabilización (KCl 130 mM, NaCl 10 mM, EGTA 2 mM, MgCl₂ 2 mM, ditiotretitol (DTT) 2 mM, y HEPES 5 mM, pH 7,3). El DTT de este tampón salino activa la SLO. Las células se lavaron dos veces a 4°C con el tampón de sellado, que es el tampón descrito pero sin DTT y con CaCl₂ 1 mM (Walev y col. 2001), y se analizó el porcentaje de permeabilización.

La saponina es un agente permeabilizante que se utiliza en protocolos de tinción intracelular con anticuerpos previa fijación de las células. También se han descrito ensayos funcionales con células no fijadas y permeabilizadas con bajas concentraciones de saponina (Johnson y col. 1996). El proceso de permeabilización se realizó a temperatura ambiente en tampón de permeabilización (PBS con MgCl₂ 5 mM y sin Ca²⁺) empleando una concentración de 10⁷ células/mL. Las células se lavaron 2 veces en el tampón de sellado a 4°C (PBS con MgCl₂ 5 mM y CaCl₂ 1 mM) y se mantuvieron en el mismo durante un tiempo de recuperación entre 30-120 min, tras lo cual se transfirieron a medio de cultivo.

El porcentaje de células permeabilizadas se determinó inmediatamente tras los lavados, por microscopía óptica mediante tinción con azul tripano o por citometría mediante tinción con yoduro de propidio.

4.3. INFECCIONES VIRALES.

4.3.1. Producción, purificación y titulación de virus.

Todos los virus se crecieron en monocapas de células CV1. Los extractos celulares fueron purificados por ultracentrifugación en colchón de sacarosa (Johnstone y col. 2004). La titulación de los virus o de los ovarios de animales infectados (tras ser homogeneizado mediante métodos mecánicos y 5 series de congelación y descongelación) se realizó mediante dilución seriada, inoculación sobre células CV-1 y tinción con cristal violeta a las 24 h. El título viral se expresa en unidades formadoras de placas (u.f.p.).

4.3.2. Infecciones virales y coinfecciones.

Las diferentes líneas celulares se infectaron con rVACV siguiendo protocolos descritos (Eisenlohr y col. 1992) con algunas modificaciones. Las células adherentes se infectaron en 200 μ l a la m.o.i. indicada a una densidad celular de 8×10^5 células/pocillo de 4,5 cm². Las BMDC se infectaron con VACV a una m.o.i. de 5-10 a una concentración de 10^7 células/mL. La adsorción viral se realizó durante 1 h a 37°C con PBS con 0,1% soroalbúmina bovina. El inóculo viral se lavó dos veces con PBS al 2% SBF, y la infección se desarrolló en medio de cultivo entre 4 y 16 h, salvo que se indique otra diferente, a una concentración aproximada de 10^6 células/mL.

En el caso de coinfecciones y triples infecciones, los virus eran añadidos de forma simultánea durante la adsorción a la m.o.i. indicada siguiendo el mismo protocolo que en infecciones simples.

La adsorción en presencia de inhibidores se realizó desde 20 min antes de la infección a una concentración del inhibidor 5 veces superior a la concentración en uso

durante el resto del proceso. Durante los lavados y la infección se utilizó la concentración estándar (Tabla 5).

4.4. INMUNIZACIÓN DE RATONES.

Se utilizaron las siguientes cepas de ratones:

- C57BL/6 o silvestres (haplotipo H-2^b)
- BALB/c (haplotipo H-2^d).
- Deficientes en TAP1 (TAP1^{-/-}) B6.129S2-Tap1tm1Arp/J (haplotipo H-2^b), (van Kaer y col. 1992), (Jackson, número de catálogo 002944).
- Deficientes en TPPII (haplotipo H-2^b). Fueron cedidos por la Dr. Gabrielle Niedermann. Aunque presentan una esperanza de vida corta, alteraciones degenerativas y una senescencia inmuno-hematopoyética (Huai y col. 2008), se han utilizado en estudios de presentación de antígeno (Firat y col. 2007).

Todas las cepas se criaron en la colonia del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España). Los ratones deficientes en TAP se criaron siempre en microaisladores independientes.

De forma general los ratones se infectaron intraperitonealmente (i.p.) con 10⁶ u.f.p. de VACV. Para determinar la respuesta en los ganglios poplíteos se infectaron en las almohadillas plantares con 5 x 10⁵ u.f.p./pata. Para el establecimiento de líneas de CTL policlonales los ratones se infectaron i.p. y de 3 a 4 semanas tras la infección se administró una dosis de recuerdo, y a partir de 3 ó 4 semanas más tarde se sacrificaron los ratones para obtener esplenocitos.

Los ratones se sacrificaron en una atmósfera con dióxido de carbono.

4.5. LINFOCITOS T.

4.5.1. Purificación de linfocitos T CD8⁺ a partir de esplenocitos obtenidos *ex vivo*.

La purificación de linfocitos T CD8⁺ a partir de una preparación de esplenocitos se llevo a cabo mediante selección magnética negativa con una mezcla de anticuerpos frente a CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, anti-MHC-clase

II, y Ter-119 conjugados con biotina, empleando bolitas magnéticas conjugadas a anticuerpo anti-biotina. Los linfocitos T CD8⁺ no marcados se recuperan por elución a través de una columna imantada. El proceso de purificación alcanza un rendimiento del 95% y se consigue la eliminación de DC contaminantes, entre otras.

4.5.2. Obtención y mantenimiento de líneas de CTL policlonales monoespecíficas de epítomos.

Las líneas de CTL específicas se generaron *in vitro* de forma estándar a partir de esplenocitos de ratones BALB/c o C57BL/6 infectados con distintos VACV según protocolos ya descritos (López y Del Val 1997). La selección de CTL específicos de un solo epítomo se llevó a cabo durante 5 días en presencia del péptido sintético específico, y al quinto día se añadió IL-2 hasta 25 unidades/mL. La expansión y mantenimiento se realizó mediante reestimulación semanal con esplenocitos pulsados con péptido y con IL-2.

En concreto la línea de CTL específicos frente al epítomo F85-93 de la proteína F de la cepa Long de RSV se generó a partir de esplenocitos de ratones BALB/c infectados con VV-F (Johnstone y col. 2004).

Las condiciones particulares de generación de las líneas de CTL monoespecíficas de epítomos de VACV derivadas de ratones C57BL/6 y deficientes en TAP se explican en detalle en los apartados de resultados 5.3.2 y 5.3.4.

4.5.3. Ensayos funcionales de presentación de antígeno a CTL.

Los ensayos funcionales de presentación antigénica a CTL realizados son ensayos de tinción intracelular de citoquinas, ICS, en los que se detecta el efecto sobre la activación de CTL, o ensayos de citotoxicidad, en los que se observa el efecto sobre la célula diana.

4.5.3.1. Ensayo de ICS con linfocitos T obtenidos *ex vivo* y con líneas de CTL.

Los ensayos de ICS se realizaron según métodos ya descritos (Chen y col. 2000; Johnstone y col. 2004). Las células del lavado peritoneal (PECs), de ganglios linfáticos o los esplenocitos obtenidos *ex vivo* o los linfocitos T CD8⁺ purificados a partir del bazo se incubaron con un exceso de péptido (10^{-6} M) o 3×10^5 células infectadas a una relación efector: diana (E:D) 1:6 salvo que se indique otra diferente, durante 2 h sin BFA y en presencia de 10 µg/mL de BFA durante 4 h más. Las líneas de CTL monoespecíficas (10^5 células) se incubaron con células infectadas o con células preincubadas con péptido (10^{-8} a 10^{-9} M) durante 4-16 h a una relación estándar E:D 1:5 en presencia de BFA. Mediante ICS se cuantifica por citometría el IFN γ sintetizado por linfocitos T CD8⁺ activados y acumulado intracelularmente debido a la presencia de BFA en el cultivo. Tras la activación, las células se marcaron con el mAb conjugado a FITC anti-CD8 α (y en algún caso con anti-CD3), y tras la fijación y permeabilización, con el mAb conjugado a ficoeritrina (PE) anti-IFN γ . Las células marcadas se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y se analizaron utilizando el programa informático FACS DIVA (BD Biosciences). Los resultados se expresaron como el porcentaje de células CD8⁺ activadas que producen IFN γ del total de células CD8⁺, es decir, % IFN γ ⁺CD8⁺/CD8⁺. El porcentaje de activación neto se calculó tras restar el obtenido con los controles. En ensayos con inhibidores, el nivel de inhibición se calculó mediante la fórmula: $100 - (\% \text{ activación neto con inhibidor} \times 100 / \% \text{ activación neto sin inhibidor})$.

4.5.3.2. Ensayos de citotoxicidad.

Los ensayos de citotoxicidad se basan en realizar una incubación de CTL y células diana que presentan los antígenos de interés, las cuales han sido previamente marcadas con el isótopo radioactivo ⁵¹Cr, lo cual permite cuantificar la liberación del isótopo al sobrenadante del cultivo al ser lisadas las dianas por los CTL específicos (Brunner y col. 1968). Los ensayos de citotoxicidad se realizaron mediante procedimientos estándar ya descritos (Del Val y col. 1988). Para medir la radiactividad se utilizó un contador de radiación gamma Packard Cobra II. Las determinaciones se realizaron por triplicado y se calculó la media. El porcentaje de lisis específica de cada muestra se calculó a partir de

la media de la lisis espontánea de las células diana en ausencia de CTL (Espontáneas), la media de la lisis de la muestra (Muestra), y la media del valor máximo de radiactividad correspondiente al total de células marcadas (Máximas). Los valores de liberación espontánea respecto a los de liberación máxima fueron siempre inferiores al 20%.

$$\% \text{ Lisis Específica} = 100 \times [(Muestra - Espontáneas) / (Máximas - Espontáneas)]$$

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y BASES DE DATOS.

Los resultados de varios ensayos se expresan como valores promedio y el error estándar de la media (SEM). Las diferencias estadísticas entre las medias de grupos experimentales se determinaron usando un test T de Student no pareado; se indica *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ***, $p < 0,001$. Mediante un análisis estadístico de ROC (*Receiver-Operating Characteristic*) se determinó el valor sobre el cual aceptamos los valores como positivos. El análisis estadístico de ROC genera una lista de distintos valores de corte que permiten una clasificación dicotómica (positivos o negativos) de los valores del estudio según sean superiores o inferiores al valor elegido en función de 2 propiedades operativas: la sensibilidad, que es la fracción de verdaderos positivos, y la especificidad, que es igual al resultado de restar a uno la fracción de falsos positivos (Zweig y Campbell 1993). En nuestro estudio seleccionamos como nivel de corte el valor con una especificidad del 86% y una sensibilidad del 72%.

La hidrofobicidad de los epítomos se calculó mediante la escala OMH (*Optimal Matching Hydrophobicity*) (Sweet y Eisenberg 1983).

La información relativa a las proteínas de VACV y de los epítomos que contienen se obtuvo de las bases de datos *Poxvirus Bioinformatics Resource* (www.poxvirus.org) y *UniProt Knowledgebase* (www.uniprot.org). La predicción de una secuencia señal se analizó con el servidor *SignalP 4.0 server* (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) y la predicción de regiones TM en las proteínas de VACV con el servidor *TMHMM Server 2.0* (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

5. RESULTADOS

5.1. INHIBICIÓN DE TAP MEDIANTE ICP47.

5.1.1. Permeabilización de células con estreptolisina O y saponina.

La proteína ICP47 del virus HSV-1 tiene la capacidad de bloquear selectivamente a los TAP humanos con una alta especificidad pero no a los murinos. Con el objetivo de conseguir un sistema de inhibición de TAP que permita disminuir la presentación de diferentes antígenos en diferentes líneas celulares y para distintos virus, se probó a bloquear TAP mediante ICP47 soluble. Para introducir este péptido en las células es necesario conseguir un método de permeabilización que permita llevar a cabo ensayos de presentación antigénica.

Se probaron 2 métodos diferentes de permeabilización, con SLO y con saponina. Se probaron en células 293K^d distintas concentraciones de SLO y de saponina durante distintos tiempos de incubación (5, 10 y 15 min). Transcurrido este tiempo, se lavaron en el tampón de sellado e inmediatamente se analizó el porcentaje de células permeabilizadas. Como se muestra en la

Figura 6A, tras 10 min de incubación con SLO no se consiguió permeabilizar las células 293K^d. Tampoco se observó un efecto de SLO en las células tras 5 y 15 min de incubación y tampoco en ensayos sobre células HeLaK^d (datos no mostrados).

Sin embargo, el porcentaje de células permeabilizadas sí aumentaba a medida que se incrementaba la concentración de saponina. Así, a partir de una concentración de saponina superior a 0,02% conseguimos permeabilizar más del 80% de las células en 10 min, determinado tanto por microscopía como por citometría (

Figura 6). Tras el tiempo de sellado (120 min), las células se pusieron en cultivo durante 2-3 días para controlar el crecimiento y la viabilidad celular. Las células 293K^d tratadas con saponina no se adherían a la placa quedando en suspensión y sin capacidad de crecimiento, indicando que la permeabilización provocaba un daño celular irreversible.

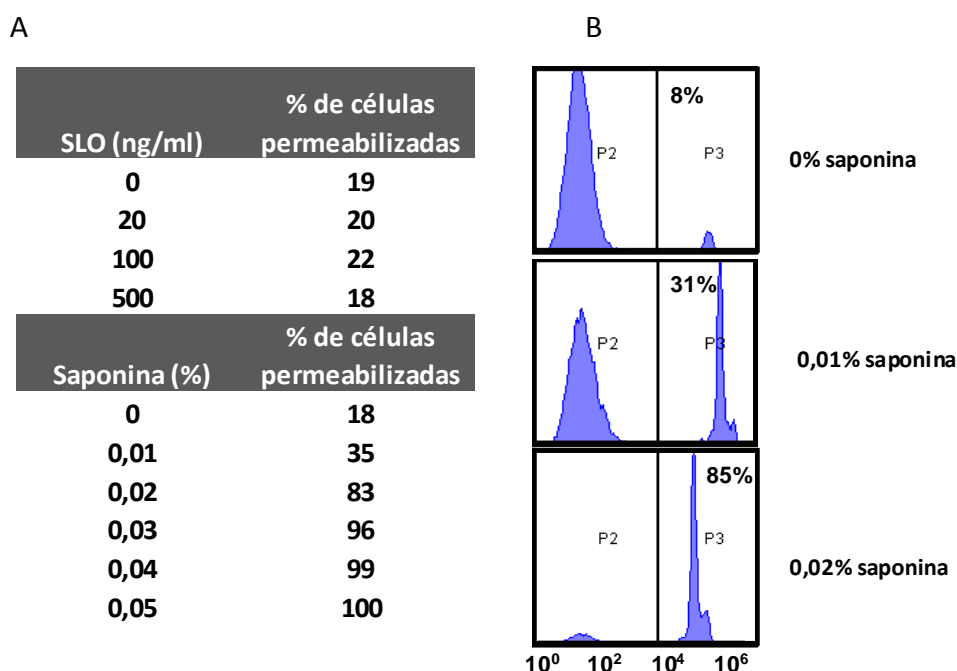


Figura 6. Las células 293K^d se permeabilizan con saponina pero no con SLO.

(A) Células 293K^d se incubaron con las concentraciones indicadas de SLO o saponina durante 10 min. Inmediatamente tras el lavado, se analizó la permeabilización de las células mediante tinción con azul de tripano por microscopía. (B) Células 293K^d se incubaron con saponina durante 10 min y tras el lavado se analizó el porcentaje de células permeabilizadas mediante tinción con yoduro de propidio por citometría de flujo. En el gráfico se indica el porcentaje de permeabilización para cada concentración de saponina. Se muestra un experimento representativo.

Aunque el daño celular era irreparable en términos de capacidad de proliferación, quisimos analizar si las células permeabilizadas podían ser infectadas y presentar epítopos a CTL en ensayos cortos de presentación de antígeno. Las células 293K^d se incubaron primero con saponina y luego con el péptido sintético F85-93, o se infectaron con el virus VV-Fsig⁻. Mediante ensayos de ICS, se analizó la presentación a CTL específicos del epítipo F85-93 de la proteína F por estas células permeabilizadas. En la Figura 7 se observa que las células tratadas con saponina presentaban tanto el péptido sintético como el epítipo viral; sin embargo, el porcentaje de CD8⁺ que sintetizan IFN γ disminuía a medida que aumentaba la concentración de saponina.

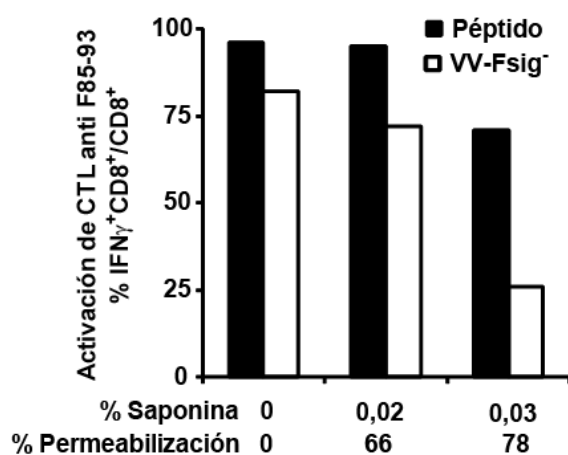


Figura 7. Activación de CTL por antígenos presentados por células permeabilizadas.

Mediante ICS se analizó la presentación a CTL específicos del epítipo F85-93 por células 293K^d permeabilizadas con saponina durante 10 min a las concentraciones indicadas e infectadas con VV-F-sig⁻ durante 3 h a m.o.i. 3 (columnas blancas) o incubadas con 10⁻⁸ M del péptido sintético (columnas negras). Se indica el porcentaje de permeabilización celular obtenido para cada porcentaje de saponina. Se muestra un experimento representativo.

Sospechábamos que sólo podían infectarse y presentar antígenos a CTL las células no permeabilizadas. Esta hipótesis se confirmó mediante tinción con yoduro de propidio de células permeabilizadas con saponina e infectadas con un rVACV que expresa una variante de la proteína verde fluorescente (VV-GFP-Jaw1-Ova). Las células permeabilizadas con 0,02% y 0,03% de saponina (teñidas con yoduro de propidio) no se infectaban ya que no expresaban la proteína verde (datos no mostrados), mientras que sí se infectaban el pequeño porcentaje de células no permeabilizadas. Estos datos demuestran que la permeabilización con saponina no permite la infección y la posterior presentación de antígeno a CTL.

5.1.2. Efecto de la inhibición de TAP en la presentación antigénica empleando un rVACV que expresa ICP47.

Con el objetivo de conseguir un sistema alternativo para bloquear TAP se utilizó un rVACV que expresa la molécula ICP47, con el cual infectamos líneas celulares humanas. Este sistema nos permitiría estudiar la presentación independiente de TAP a linfocitos T CD8⁺ de múltiples antígenos virales presentados por diversas moléculas de MHC de clase I, coinfectando las células con varios rVACV que expresasen el antígeno y la molécula presentadora de interés.

Se coinfectaron células humanas HeLa con 3 rVACV: el rVACV-ICP47, el VV-Fsig⁻ que expresa la proteína Fsig⁻ que contiene el epítipo F85-93, y el rVACV-K^d que expresa la molécula de MHC de clase I presentadora. La proteína Fsig⁻ es la proteína F de RSV

pero sin secuencia señal, y su epítipo F85-93 se presenta sólo de forma dependiente de TAP. Tras la infección, las dianas se marcaron con ^{51}Cr y se enfrentaron a CTL específicos de F85-93 en un ensayo de citolisis (Figura 8). Ninguno de los rVACV de forma individual provocaba la lisis de las células por los CTL (datos no mostrados), como era esperable. Sin embargo, la triple infección con el rVACV-ICP47 provocó una inexplicable potenciación de la presentación del epítipo F85-93. Por tanto, no observamos un efecto inhibitor específico de rVACV-ICP47 sobre TAP y la presentación del antígeno F85-93.

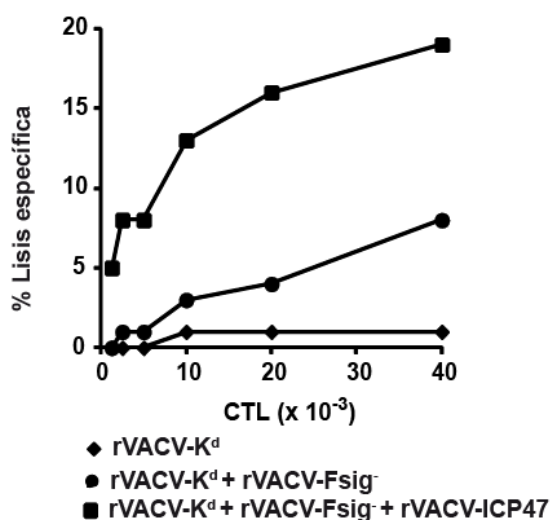


Figura 8. rVACV-ICP47 no inhibe la presentación dependiente de TAP en un sistema de infección triple.

Células HeLa se coinfectaron durante 3 h de forma simultánea con diferentes combinaciones de los rVACV que expresan respectivamente: K^d (m.o.i. 3), la proteína Fsig⁻ (m.o.i. 3) e ICP47 (m.o.i. 10) según se indica. Tras la infección, las células se incubaron con ^{51}Cr y se cocultivaron 10^3 dianas marcadas con CTL específicos de F85-93 a diferentes relaciones E:D. Se muestra un experimento representativo.

A continuación, se ensayó un sistema de doble infección, analizando la presentación del antígeno F85-93 a CTL específicos por células 293K^d humanas coinfectadas con el virus VV-Fsig⁻ y con rVACV-ICP47 (Figura 9). No se observó una disminución específica en la presentación de F85-93 al coinfectar con rVACV-ICP47 respecto a la presentación total del epítipo a partir de Fsig⁻. Se obtuvieron los mismos resultados en ensayos de 3 h y 6 h de coinfección (datos no mostrados). Concluimos que el rVACV-ICP47 no es útil como método para bloquear la presentación de epítipos dependientes de TAP mediante un sistema de doble o triple infección.

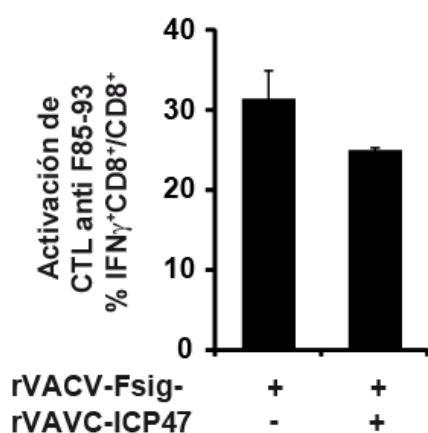


Figura 9. rVACV-ICP47 no inhibe la presentación dependiente de TAP en un sistema de doble infección.

La línea de CTL F85-93 se estimuló con células 293K^d coinfectadas durante 1 h con el virus VV-Fsig⁻ (m.o.i. 3) y con rVACV-ICP47 (m.o.i. 20-40) en un sistema de doble infección según se indica. Mediante ICS se determinó la producción de IFN γ como medida de la activación de los linfocitos T CD8⁺. Datos obtenidos de 2 ensayos independientes.

5.1.3. Efecto de la inhibición de TAP en la presentación de un epítipo propio de VACV empleando el rVACV que expresa ICP47.

El rVACV-ICP47 deriva de la misma cepa que el VACV WR excepto que expresa la molécula de interferencia ICP47. Mediante un protocolo de infección simple, células 293K^b se infectaron con WR o rVACV-ICP47 y se realizaron ensayos de presentación del epítipo de VACV dependiente de TAP, B8R, presentado por H-2K^b a CTL específicos. ICP47 bloqueó totalmente la presentación del epítipo B8R en las células humanas 293K^b infectadas con rVACV-ICP47. Como control las dianas infectadas con rVACV-ICP47 e incubadas con el péptido sintético B8R sí eran capaces de activar los CTL específicos (Figura 10A). Además, se controló la presentación del epítipo B8R por fibroblastos murinos embrionarios, MEF, infectados con rVACV-ICP47, en los que ICP47 no se une a TAP (datos no mostrados). Estos datos indican que la proteína ICP47 era funcional en el rVACV-ICP47 ya que bloquea TAP y disminuye la presentación endógena de epítopos dependientes del transportador mediante un sistema de infección simple, en el que el antígeno e ICP47 son expresados por el mismo rVACV.

Estos datos nos llevaron a analizar de nuevo un sistema de coinfección con la diferencia de que el antígeno y la molécula de interferencia se localicen en el mismo rVACV. Se realizaron ensayos similares con células 293 transfectadas con el alelo L^d (que no presenta el epítipo B8R) coinfectadas con rVACV-K^b y con rVACV-ICP47 y se observó de nuevo una inhibición específica de la presentación del epítipo B8R (Figura 10B). Concluimos que el rVACV-ICP47 expresa ICP47 y que es capaz de inhibir la presentación

de epítomos virales dependientes de TAP que se expresan de forma simultánea por el mismo virus recombinante, tanto en un sistema de infección simple como en un sistema de coinfección.

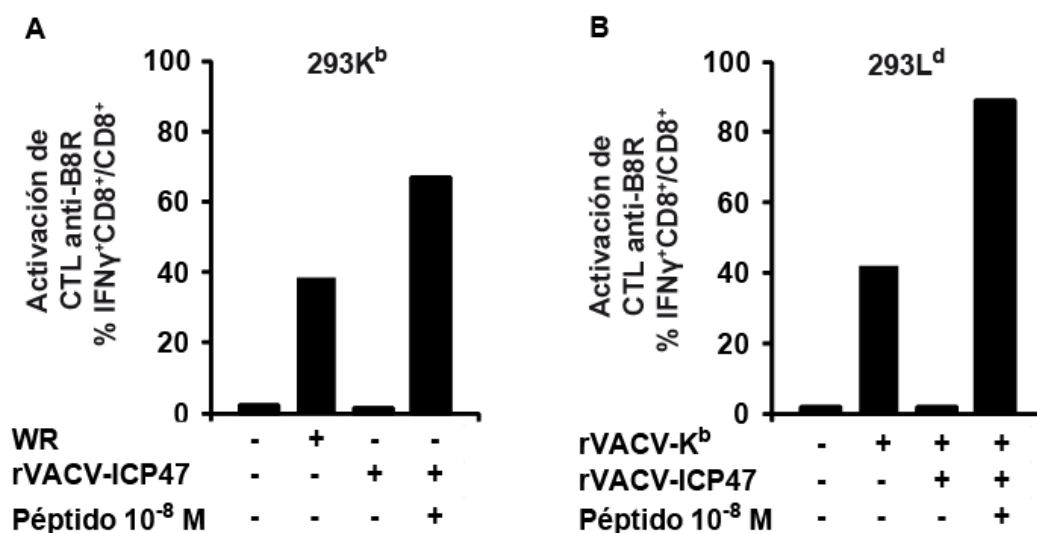


Figura 10. rVACV-ICP47 inhibe la presentación del epítomo B8R cuando se expresa de forma simultánea con ICP47.

Se analizó mediante ICS la presentación del epítomo B8R en A) un sistema de infección simple de células 293K^b con WR o con rVACV-ICP47 durante 4 h a m.o.i. 10 o B) un sistema de coinfección de las células 293L^d con rVACV-K^b (m.o.i. 3) y con rVACV-ICP47 (m.o.i. 10) durante 4 h que se enfrentaron a CTL específicos anti-B8R. Como control, las células infectadas se incubaron con el péptido B8R 10⁻⁸ M. Se indica el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN γ como medida de la activación. Se muestra un experimento representativo en cada caso.

Mientras teníamos las dificultades descritas para desarrollar un sistema versátil para analizar mediante ICP47 la presentación de antígenos independiente de TAP, decidimos probar con el modelo de ratón genéticamente deficiente en TAP. Dados los buenos resultados obtenidos, el resto del trabajo experimental se realizó en ese sistema y se describe en las siguientes secciones de esta memoria.

5.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PRESENTACIÓN INDEPENDIENTE DE TAP DE ANTIGENOS DE VACV.

5.2.1. Respuesta primaria específica de linfocitos T CD8⁺ deficientes en TAP frente a células infectadas por VACV.

Se acepta generalmente que la principal fuente de antígenos presentados por MHC de clase I son péptidos citosólicos que acceden al RE a través del transportador TAP. Sin embargo, se han descrito tanto vías de presentación de antígenos que no requieren TAP, como la presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos de algunos antígenos en ratones y seres humanos genéticamente deficientes en TAP. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar la relevancia de rutas alternativas de presentación de antígenos de VACV por MHC de clase I. Como parte principal de nuestro trabajo, analizamos la contribución de las rutas independientes de TAP.

Para ello, estudiamos la respuesta inmune global de linfocitos T CD8⁺ frente a la infección por VACV en el modelo de ratón deficiente en TAP. Para detectar la respuesta se realizaron ensayos de ICS *ex vivo* en los que analizamos si PECs, esplenocitos o células de los ganglios linfáticos se estimulaban por antígenos presentados por BMDC TAP⁺ o TAP⁻ infectadas con el virus, ya que se ha descrito que las BMDC infectadas con VACV pueden activar de forma directa a linfocitos T CD8⁺ (Yates y Alexander-Miller 2007; Xu y col. 2010).

Tras la infección i.p. y en las almohadillas plantares detectamos a los 7 d.p.i. una población de linfocitos T CD8⁺ en el peritoneo, en los ganglios poplíteos y en el bazo de los ratones deficientes en TAP, que se activaban al reconocer las células infectadas por VACV, tal como se muestra en la Figura 11A. A pesar de que los ratones deficientes presentan una reducción aproximadamente de 10 a 20 veces en el número de linfocitos T CD8⁺ respecto a los ratones C57BL/6, aproximadamente un tercio de los linfocitos T CD8⁺ del peritoneo de los ratones deficientes en TAP y un 3% del bazo se activaron tras la estimulación (Figura 11B). Las BMDC TAP⁻ infectadas estimulaban el mismo porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que las BMDC TAP⁺ infectadas, sugiriendo la existencia de epítomos independientes de TAP e indicando que se procesan aproximadamente con la misma eficiencia en ambos tipos de células presentadoras (Figura 11B). Observamos

el mismo porcentaje de activación de linfocitos T CD8⁺ en el bazo o en el peritoneo de ratones deficientes en TAP cuando se infectaron únicamente por vía i.p. Así, todos los ensayos posteriores se realizaron con ratones inmunizados exclusivamente por vía i.p.

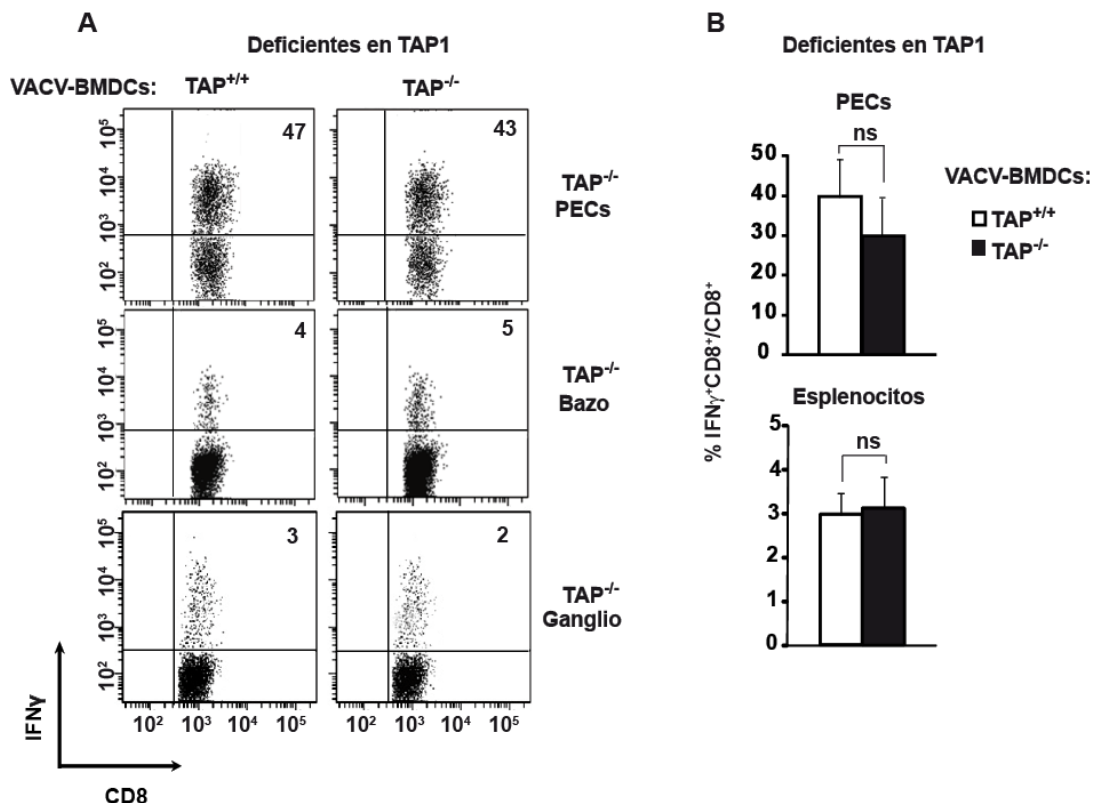


Figura 11. La infección por VACV induce en los ratones deficientes en TAP una respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ que reconocen células infectadas con el virus.

Se analizó la respuesta aguda primaria de linfocitos T CD8⁺ 7 días tras la infección i.p. con 10⁶ u.f.p. y 5 x 10⁵ u.f.p. /pata con VACV. Mediante ensayos de ICS *ex vivo* se analizó la producción de IFN γ por las células de lavado peritoneal, bazo y ganglios drenantes extraídos de ratones deficientes en TAP e infectados, tras ser cocultivadas con BMDC TAP⁺ o TAP⁻ infectadas. A, población de linfocitos T CD8⁺ de diferentes órganos de un ratón deficiente en TAP e infectado representativo estimulado con ambos tipos de BMDC infectadas. En el cuadrante superior derecho se muestra el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que se activan. B, Las gráficas representan la media y el SEM de los porcentajes de IFN γ producidos por los linfocitos T CD8⁺ específicos frente a células infectadas TAP⁺ o TAP⁻ en 6 ensayos. n.s., no significativo.

5.2.2. Respuesta primaria específica de linfocitos T CD8⁺ silvestres frente a células deficientes en TAP e infectadas por VACV.

Para analizar si los epítomos procesados de forma independiente del transportador en las células infectadas eran capaces de activar linfocitos T CD8⁺ de ratones silvestres,

se realizaron ensayos similares de ICS *ex vivo*. Así, tras la infección con VACV, detectamos también en el peritoneo y en el bazo de ratones C57BL/6 una población de linfocitos T CD8⁺ que producían IFN γ tras la estimulación con ambos tipos de BMDC infectadas (Figura 12A). La activación de los linfocitos T CD8⁺ silvestres era mayor cuando se enfrentaban a BMDC TAP⁺ infectadas que cuando se presentaban a dianas infectadas que carecían de TAP pero aproximadamente un tercio de los linfocitos T CD8⁺ que se activaban en respuesta a células infectadas con VACV lo hacían de forma independiente de TAP (Figura 12B). Por tanto, aunque los ratones silvestres respondían mejor a células que pueden realizar la ruta clásica de presentación de antígeno dependiente de TAP, parecen existir vías que no requieren TAP y que activan linfocitos T CD8⁺. Estas vías independientes de TAP serían las que activan también a linfocitos T CD8⁺ en los ratones deficientes en TAP.

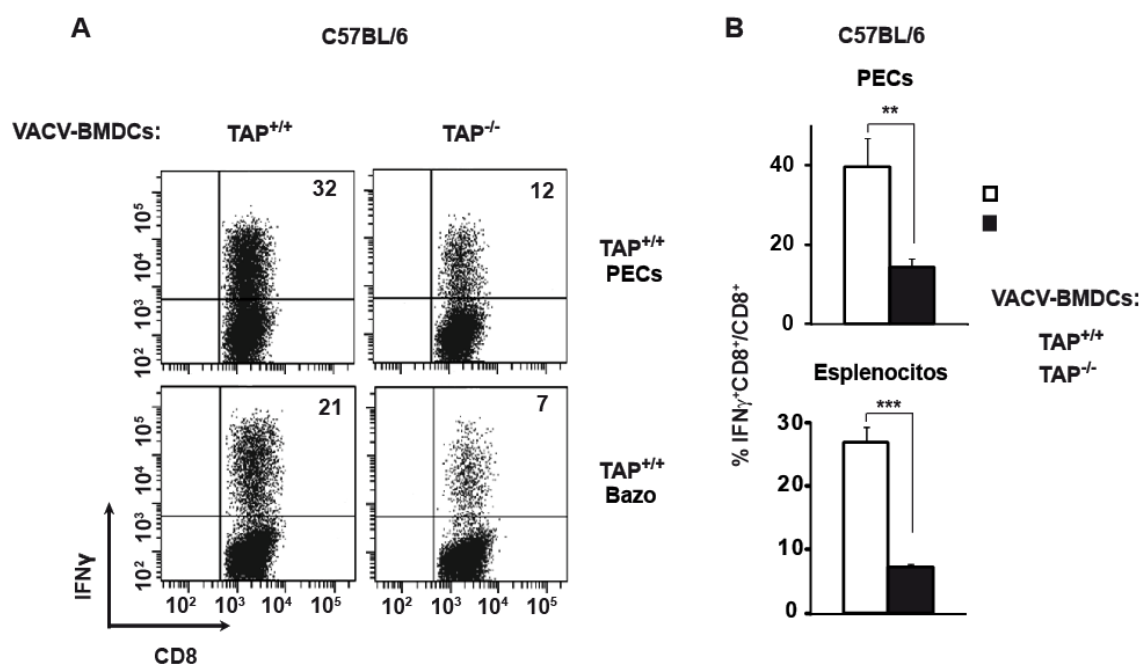


Figura 12. Los linfocitos T CD8⁺ de ratones silvestres reconocen BMDC deficientes en TAP e infectadas con VACV.

La respuesta primaria de los linfocitos T CD8⁺ de ratones silvestres frente a la infección por VACV fue analizada como en la Figura 11. Se determinó mediante ICS *ex vivo* la producción de IFN γ por las PEC o por los esplenocitos frente a BMDC infectadas TAP⁺ o TAP⁻. En A, se muestra un ensayo representativo de la activación de los linfocitos T CD8⁺ detectado en un ratón silvestre. Los números en los cuadrantes representan el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN γ . La cuantificación del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ específicos frente a BMDC TAP⁻ o TAP⁺ infectadas se representa en B. Datos obtenidos de 6 experimentos con esplenocitos y 3 experimentos con lavado peritoneal.

En ratones C57BL/6, sólo el 30-40% de las PECs o el 10-15% de los esplenocitos son linfocitos T CD8⁺. Entre las células restantes hay APC profesionales, que podrían interferir con los resultados cuando estas poblaciones se enfrentan a células infectadas que carecen de TAP. Por ejemplo, las APC TAP⁺ podrían fagocitar las BMDC TAP⁻ infectadas y hacer presentación cruzada a los linfocitos T CD8⁺ TAP⁺ de los ratones C56BL/6. Otra posibilidad es que virus infeccioso residual o producido en las BMDC TAP⁻ infectadas pudiese infectar secundariamente a las APC TAP⁺ y así presentar antígenos virales de forma directa y dependiente de TAP a los linfocitos T CD8⁺ TAP⁺ de los ratones C56BL/6 (Figura 13).

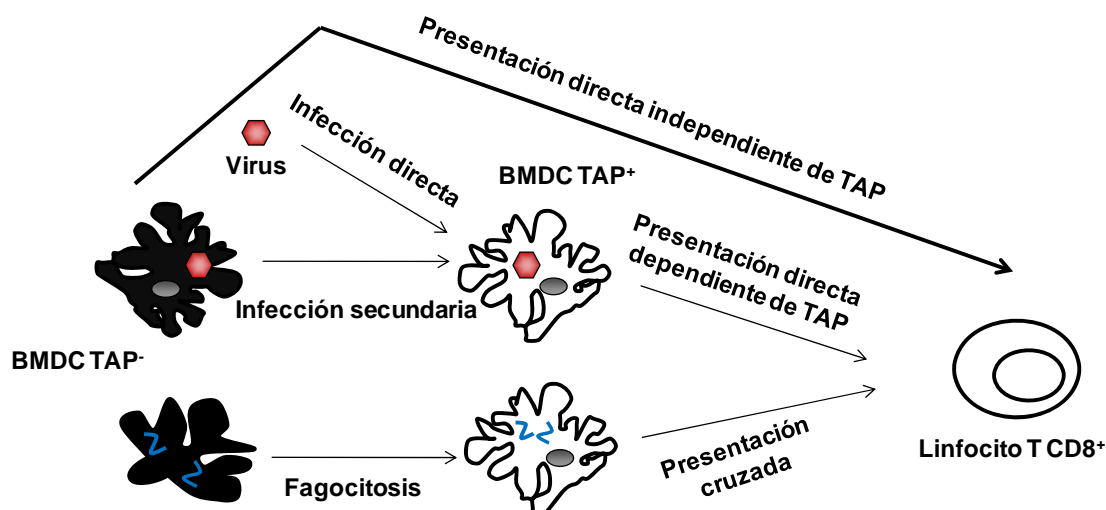


Figura 13. Posibles rutas de presentación directa y cruzada de antígenos de VACV a linfocitos T CD8⁺ en nuestro sistema.

El objetivo experimental es detectar la presentación directa e independiente de TAP por BMDC TAP⁻ infectadas (negro) a linfocitos T CD8⁺ del bazo de un ratón silvestre previamente infectado. Sin embargo, en nuestras muestras podían ocurrir otras situaciones: La BMDC TAP⁺ existentes en los esplenocitos se infectarían de forma directa con virus residual o de forma secundaria con virus liberado de las BMDC TAP⁻ infectadas. Estas células procesarían de forma endógena y dependiente de TAP el antígeno viral y lo presentarían a linfocitos T CD8⁺ de forma directa. Por otro lado, las BMDC TAP⁺ podrían incorporar por fagocitosis los restos de BMDC TAP⁻ infectadas circundantes y presentarlos de forma cruzada a linfocitos T CD8⁺.

Quisimos controlar si la activación de los linfocitos T CD8⁺ observada en nuestros ensayos se producía por la presentación directa e independiente de TAP de antígenos por las BMDC TAP⁻ infectadas. Para ello, se realizaron ensayos de ICS *ex vivo* en los que enfrentamos esplenocitos obtenidos de ratones C57BL/6 (con haplotipo H-2^b) con BMDC singénicas infectadas (de haplotipo H-2^b) TAP⁺ o TAP⁻ o con BMDC de ratones alogénicos

BALB/c (con haplotipo H-2^d) infectadas con el virus. Sorprendentemente, los linfocitos T CD8⁺ de la mezcla de esplenocitos se activaban inespecíficamente frente a las BMDC alogénicas H-2^d infectadas de forma similar a lo que se observaba en presencia de BMDC singénicas TAP⁻ infectadas (Figura 14A). Por ello, purificamos los linfocitos T CD8⁺ mediante selección negativa a partir de las poblaciones celulares u órganos *ex vivo*.

En la Figura 15 se muestran poblaciones representativas de linfocitos T CD8⁺ purificados, demostrando que son viables para ensayos de presentación de antígeno. Tampoco observamos ninguna alteración morfológica ni funcional de los linfocitos T CD8⁺ purificados y éstos expresaban niveles de IFN γ similares a los linfocitos T CD8⁺ no purificados. El hecho de que el % de linfocitos activados observado sea mayor cuando utilizamos esplenocitos puede deberse a que las APC presentes en ellos podrían disminuir la relación E:D respecto a la que se mantiene durante el cocultivo con los linfocitos purificados. En la Figura 15 se muestra un experimento representativo, y en la Figura 14B la media de 6 experimentos con los linfocitos T CD8⁺ purificados, observándose que la activación inespecífica por las BMDC H-2^d infectadas desaparecía, mientras que se mantenía el reconocimiento singénico de las BMDC infectadas de haplotipo específico H-2^b, incluidas las BMDC TAP⁻ infectadas.

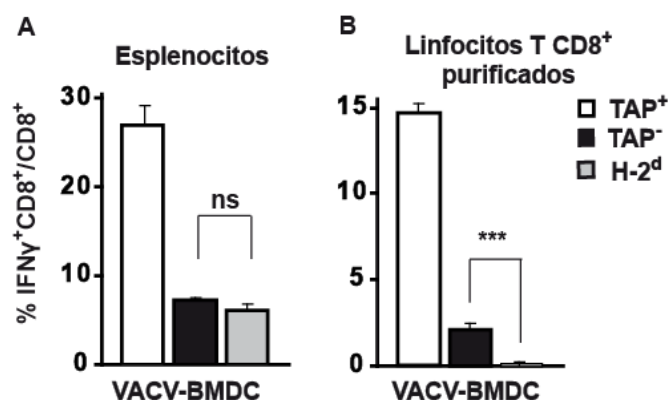


Figura 14. La purificación de linfocitos T CD8⁺ efectores es un paso necesario para identificar la población que se activa específicamente al reconocer ligandos unidos a H-2^b que no requieren TAP.

Los esplenocitos (A) o los linfocitos T CD8⁺ purificados del bazo (B) de ratones C57BL/6 infectados con WR, se estimularon con 3×10^5 BMDC H-2^b TAP⁺, H-2^b TAP⁻ o con BMDC TAP⁺ con haplotipo H-2^d, infectadas en todos los casos con VACV. La producción de IFN γ como medida de la activación se determinó mediante ICS *ex vivo*. Los datos obtenidos se muestran como media de 6 experimentos.

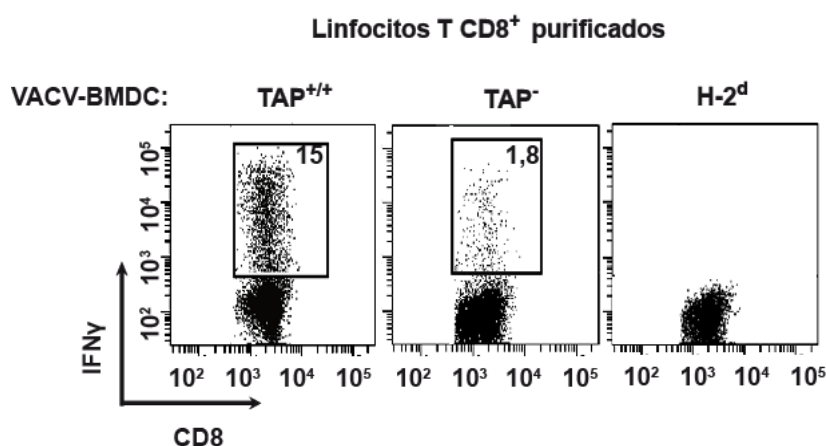


Figura 15. Los linfocitos T CD8⁺ purificados son viables y permiten realizar ensayos de presentación de antígeno.

Se muestra una población representativa de linfocitos T CD8⁺ purificados del bazo de ratones C57BL/6 infectados con WR y re-estimados con 3×10^5 BMDC H-2^b TAP⁺, H-2^b TAP⁻ o con BMDC TAP⁺ con haplotipo H-2^d, infectadas en todos los casos con VACV. Se determinó la producción de IFN γ mediante ICS *ex vivo* como medida de la activación.

Como control, se observó que los esplenocitos y linfocitos T CD8⁺ purificados del bazo de ratones BALB/c infectados se activaban con BMDC H-2^d infectadas indicando la capacidad presentadora de antígenos virales de estas últimas (Figura 16).

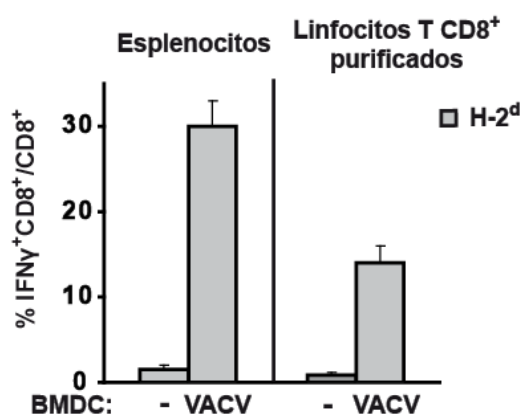


Figura 16. Control de presentación de antígeno por BMDC infectadas a linfocitos T CD8⁺ en el haplotipo H-2^d.

Esplenocitos o linfocitos T CD8⁺ purificados del bazo de ratones BALB/c infectados con WR, se estimularon con 3×10^5 BMDC derivadas de la misma cepa de ratón sin infectar o infectadas con el virus (tal y como se describe en las figuras 14 y 15). Se determinó la producción de IFN γ mediante ICS *ex vivo* como medida de la activación.

Estos resultados indican que cuando habíamos utilizado esplenocitos de los ratones C57BL/6, las APC presentes en ellos, habían interferido con la interpretación de los resultados. Concluimos que teníamos evidencias claras de una presentación directa e independiente de TAP pero que para realizar una cuantificación más exacta era necesario purificar los linfocitos T CD8⁺.

5.2.3. Cuantificación global de la presentación directa e independiente de TAP de antígenos de VACV.

Con el fin de cuantificar de una forma más exacta la contribución de la presentación de antígeno directa e independiente de TAP a la respuesta global de linfocitos T CD8⁺ silvestres frente a VACV, analizamos la activación de los linfocitos T CD8⁺ purificados del bazo de ratones silvestres infectados tras la estimulación con distintas cantidades de BMDC TAP⁺ o TAP⁻ (Figura 17B) mediante ensayos de ICS *ex vivo*. Se usaron BMDC H-2^d infectadas para controlar la ausencia de activación inespecífica. El mismo ensayo se realizó con los esplenocitos totales (Figura 17A).

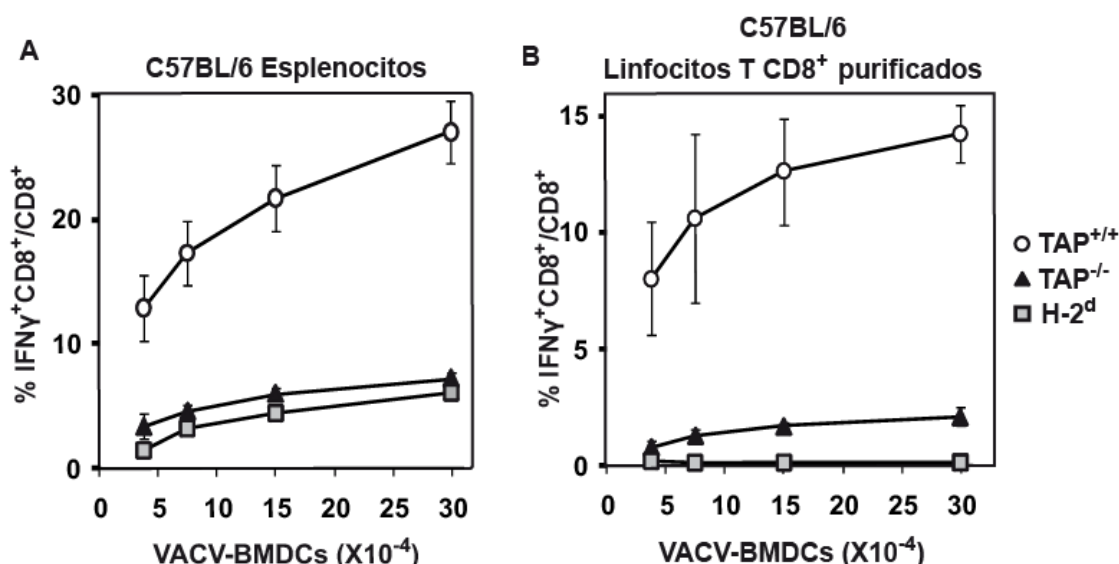


Figura 17. Cuantificación de la respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ frente a antígenos de VACV que siguen vías independientes de TAP.

Los esplenocitos (A) o los linfocitos T CD8⁺ purificados del bazo (B) de ratones C57BL/6 infectados con WR, se estimularon con BMDC de haplotipo H-2^b derivadas de ratones C57BL/6 (círculos) o deficientes en TAP (triángulos) o con BMDC de haplotipo H-2^d derivadas de ratones BALB/c (cuadros), infectadas con VACV, como células presentadoras de antígenos. Se analizó la respuesta primaria (7 días tras la infección) midiendo la producción de IFN γ por ICS a diferentes relaciones E:D. Los gráficos representan la media y el error estándar de 6 experimentos distintos.

En los ratones deficientes en TAP no se realizó la purificación de los linfocitos T CD8⁺. Los bazos de estos ratones tienen tan solo un 1-2% de CD8⁺, por lo que es difícil aislarlos por selección negativa, obteniéndose sólo un 30-40% de pureza tras la

purificación. Este problema metodológico impidió discriminar si la activación de los linfocitos T CD8⁺ de los ratones deficientes se debía a antígenos presentados de forma directa por las APC que carecen de TAP, o por la presentación cruzada de antígenos, sin embargo, en cualquiera de los casos serían mecanismos independientes de TAP.

Los linfocitos T CD8⁺ H-2^b silvestres no reconocen antígenos presentados por las células H-2^d infectadas a ninguna relación E:D, sin embargo sí reconocen antígenos en la superficie de BMDC H-2^b infectadas. Comparando porcentualmente la respuesta frente a BMDC TAP⁻ infectadas respecto a la respuesta total (representada por la respuesta frente a BMDC TAP⁺ infectadas) se estima que aproximadamente un 13% de los linfocitos T CD8⁺ que responden frente a VACV se activan por antígenos presentados por vías independientes de TAP (Figura 17B y Figura 18).

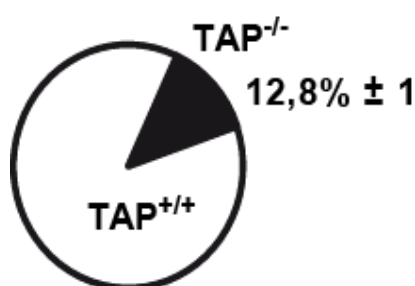


Figura 18. Extensión de la respuesta de linfocitos T CD8⁺ activados por antígenos de VACV que no requieren TAP para su presentación.

En el gráfico se muestra la contribución de las vías independientes de TAP a la respuesta global frente a antígenos de VACV de linfocitos T CD8⁺ en un ratón C57BL/6. Resumen de los datos obtenidos de 6 experimentos.

5.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS EPÍTOPOS DE VACV QUE SE PRESENTAN DE FORMA INDEPENDIENTE DE TAP.

5.3.1. Respuesta primaria de linfocitos T CD8⁺ específicos frente a epítomos individuales de VACV.

Habiendo demostrado que una parte de los linfocitos T CD8⁺ silvestres responden *ex vivo* a antígenos que se presentan de forma independiente de TAP, quisimos ver si esta respuesta se debía a la presentación de algún epítipo dominante o la combinación de varios de similar fortaleza. Se han descrito recientemente 49 epítomos de VACV restringidos por H-2^b murino (Tscharke y col. 2005). Ordenamos los epítomos de mayor a menor según el valor de ICS descrito o en su defecto el valor de ELISPOT (Tscharke y col. 2005) y elegimos los 25 primeros epítomos. Seleccionamos también el epítipo A19L del

que se había descrito previamente activación *in vivo* de linfocitos T CD8⁺ (Moutaftsi y col. 2006). Elegimos además otros 3 epítomos que derivan de proteínas de membrana y 1 que deriva de una proteína citosólica, por razones diversas. Los epítomos seleccionados dan cuenta de más del 90% de la respuesta global frente a VACV en el contexto de H-2^b.

Con el objetivo de estudiar la respuesta primaria de linfocitos T CD8⁺ frente a cada uno de los epítomos individuales seleccionados, se cultivaron las PECs de ratones C57BL/6 o deficientes en TAP infectados i.p. 7 días antes con VACV y se estimularon *ex vivo* con cada uno de los péptidos sintéticos correspondientes. La producción de IFN γ por los linfocitos T CD8⁺ activados se midió mediante ensayos de ICS. Los 30 péptidos analizados activaban linfocitos T CD8⁺ procedentes de ratones C57BL/6 infectados con VACV y, de manera interesante, 12 de estos inducían además la respuesta en ratones deficientes en TAP e infectados (Figura 19).

Los epítomos L2R53, A19L, F5L y A38L activaban un % de linfocitos T CD8⁺ similar en ambos ratones y curiosamente el epítomo J3R parecía más eficiente en los ratones que carecen de TAP. Los epítomos G8R, A8R189, A6L, A23R, A25L, F13L y E8R activaban un % de CD8⁺ mayor en los ratones silvestres. En la Figura 20 podemos observar el patrón de respuesta frente a los 12 epítomos independientes de TAP de cada uno de los ratones analizados de forma individual. La jerarquía de inmunodominancia en los ratones deficientes en TAP es claramente diferente a la que aparece en ratones silvestres, siendo J3R el epítomo inmunodominante en la respuesta de los ratones deficientes en TAP (Figura 21).

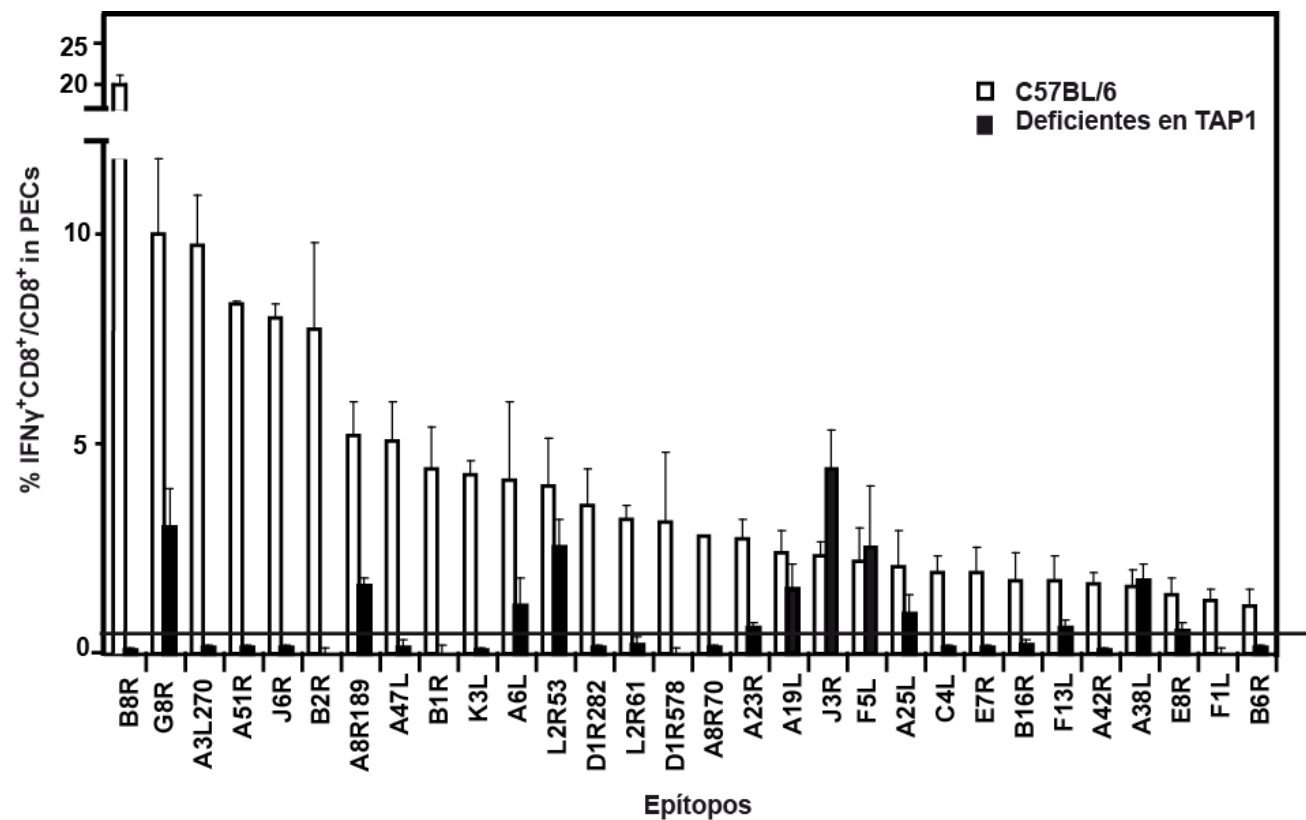


Figura 19. La infección por VACV induce en los ratones deficientes en TAP una respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ que reconocen al menos 12 epítomos virales.

Se analizó la respuesta aguda primaria de linfocitos T CD8⁺ derivados de ratones C57BL/6 (blanco) o deficientes en TAP (negro) infectados con WR frente a 30 epítomos de VACV. Mediante ICS *ex vivo* se determinó la producción de IFN γ en $1-2 \times 10^6$ células del lavado peritoneal estimuladas con los 30 péptidos sintéticos (10^{-6} M). Las columnas muestran el valor promedio del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que se activan frente a cada epítipo. Se analizaron un mínimo de 3 ratones por grupo y por epítipo. El valor a partir del cual se dan como positivos los valores, se calculó mediante un estudio de ROC y se indica con una línea negra.

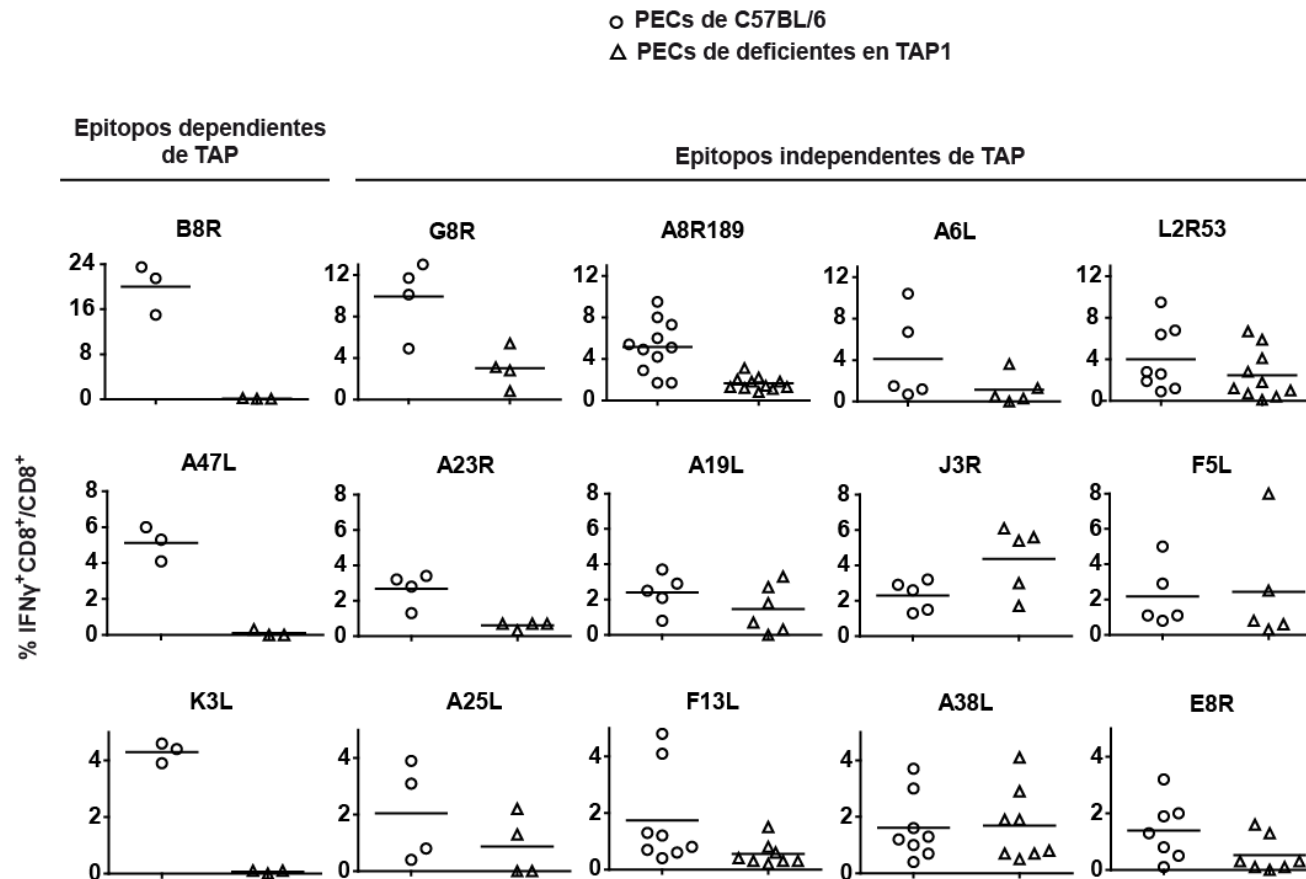


Figura 20. Respuesta individual de ratones infectados C57BL/6 y deficientes en TAP frente a los 12 epítomos de VACV que no requieren de TAP.

La producción media de IFN γ de los linfocitos T CD8 $^{+}$ está mostrada en la Figura 19. El gráfico muestra la respuesta individual de producción de IFN γ de los linfocitos T CD8 $^{+}$ de los ratones C57BL/6 (círculos) y deficientes en TAP (triángulos) infectados con WR tras la estimulación con los 12 péptidos sintéticos. Como control se muestra a la izquierda la respuesta frente a 3 epítomos dependientes de TAP (B8R, A47L y K3L). Las líneas horizontales indican los valores medios de cada grupo.

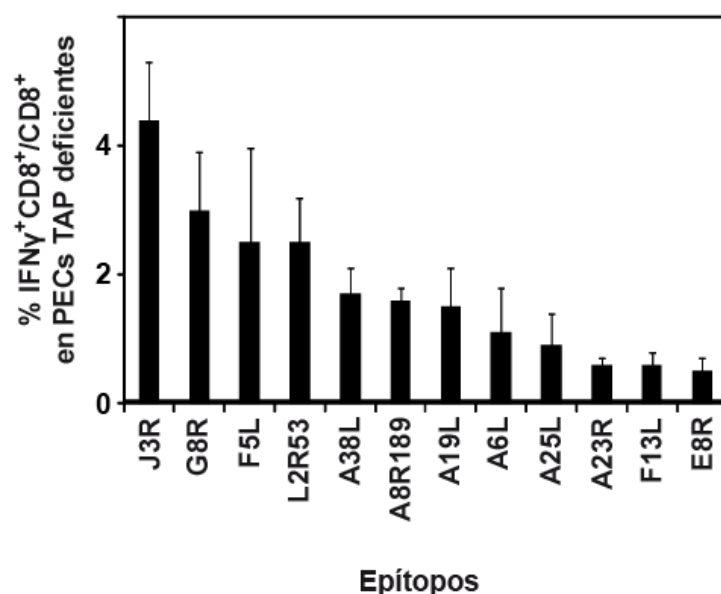


Figura 21. La jerarquía de inmunodominancia en los ratones deficientes en TAP es diferente a la observada en ratones silvestres.

Las columnas muestran el valor promedio del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que se activan frente a cada epítipo en PECs que derivan de ratones deficientes en TAP infectados. El orden jerárquico se establece en base a los datos de la Figura 19.

5.3.2. Establecimiento *in vitro* de líneas de CTL específicas frente a epítopos de VACV derivadas de ratones C57BL/6 y reconocimiento de BMDC infectadas.

Hemos demostrado que varios péptidos de VACV pueden activar linfocitos T CD8⁺ en ratones que no expresan TAP. Para analizar si estos epítopos pueden ser procesados y presentados en las BMDC infectadas nos propusimos generar *in vitro* líneas de CTL monoespecíficas de cada uno de los 30 epítopos analizados para realizar ensayos de presentación antigénica en cultivo celular.

La mayoría de las líneas de CTL se generaron a partir de esplenocitos obtenidos de ratones infectados con WR o Δ B8R y que estaban ya en un estado de memoria tras una infección secundaria. El virus mutante Δ B8R se utilizó, en la mayoría de los casos, para la inmunización secundaria, para intentar reducir la expansión de CTLs específicos para el epítipo B8R, inmunodominante y dependiente en TAP, generado en la respuesta primaria frente a WR. Algunas líneas de CTL se obtuvieron también a partir del bazo de ratones inmunizados con WR en el periodo de respuesta aguda primaria (7 d.p.i.). De forma general, se utilizaron concentraciones de péptido sintético entre 10^{-8} M y 10^{-10} M para estimular las líneas y se seleccionó la óptima en cada caso (Tabla 6).

Epítipo	Agente de la primera inmunización	Estado ^a	Órgano de origen ^b	Concentración de péptido ^c
A19L (47-55)	WR o ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A23R (297-305)	WR	aguda 1 ^a	Bazo	10 ⁻⁸ M
A25L (261-274)	WR	aguda 1 ^a y memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A38L (203-210)	ΔB8R / mDC-A38L	memoria/ aguda 2 ^a	Bazo	10 ⁻⁸ M
A3L (270-277)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A42R (88-96)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A47L 138-146	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A51R (78-85)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A6L (265-272)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
A8R (189-196)	WR o ΔB8R/ mDC-A8R189	aguda 1 ^a y memoria/ aguda 2 ^a	Bazo o médula ósea	10 ⁻⁹ M
A8R (70-77)	ΔB8R / mDC-A8R70	memoria/ aguda 2 ^a	Bazo	10 ⁻⁸ M
B16R (275- 283)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
B1R (92-99)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
B2R (54-62)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁸ M
B6R 108-116	WR o ΔB8R	aguda 1 ^a y memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
B8R (20-27)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
C4L (125-132)	WR o ΔB8R	aguda 1 ^a	Bazo	10 ⁻⁸ M
D1R (282-290)	WR o ΔB8R / mDC-D1R282	memoria/ aguda 2 ^a	Bazo	No específica
D1R (578-586)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
E7R (130-137)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
E8R (141-150)	WR o ΔB8R / mDC-E8R	memoria/ aguda 2 ^a	Bazo	No específica
F13L (307-315)	WR o ΔB8R/ mDC-F13L	memoria/ aguda 2 ^a	Bazo	10 ⁻¹⁰ M
F1L (200-207)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
F5L (279-287)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻¹⁰ M
G8R (34-41)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁸ M
J3R (289-296)	WR o ΔB8R	aguda 1 ^a y memoria	Bazo o médula ósea	10 ⁻⁹ M
J6R (993-1000)	ΔB8R	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
K3L (6-15)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁹ M
L2R (53-61)	WR	aguda 1 ^a y memoria	Bazo o médula ósea	10 ⁻⁹ M
L2R (61-69)	WR o ΔB8R / mDC-L2R61	memoria/ aguda 2 ^a	Bazo	No específica

Tabla 6. Líneas de CTL derivadas de ratones C57BL/6 generadas para realizar ensayos de presentación antigénica.

Las líneas de CTL monoespecíficas se nombraron como el epítipo frente al cual se generan. El agente utilizado en la mayoría de las inmunizaciones secundarias fue ΔB8R. ^a La respuesta aguda primaria (1^a) se refiere a 7 d.p.i. tras la primera inmunización, la aguda secundaria (2^a) se

refiere a 6 d.p.i. tras la segunda infección y la de memoria se refiere a 3 semanas tras la segunda infección. ^b Las líneas derivadas de células de médula ósea proceden siempre de un estado de memoria tras la infección secundaria. ^c Se indica la concentración de péptido óptima utilizada durante la reestimulación.

La especificidad de cada línea de CTL generada se comprobó mediante la detección del IFN γ intracelular producido por los CTL en respuesta a la estimulación por BMDC cargadas con 10^{-8} M del péptido sintético. Consideramos que las líneas de CTL eran específicas cuando como mínimo un 65-80% de los linfocitos T CD8⁺ se activaban de forma específica frente al péptido sintético. Así, partiendo de esplenocitos de ratones C57BL/6 infectados con VACV conseguimos generar líneas de CTL específicas para 27 de los péptidos analizados.

No conseguimos obtener líneas de CTL específicas para los epítomos L2R61, D1R282 ni E8R a partir de ratones C57BL/6. Por el contrario sí obtuvimos una línea de CTL específica frente a E8R a partir del bazo de un ratón deficiente en TAP (ver apartado 5.3.4).

Para obtener algunas líneas de CTL concretas se probaron distintos agentes de inmunización, o distintos órganos de origen. Como alternativa a la primera infección con el virus, se probó la inmunización con BMDC maduras con LPS y cargadas con el péptido específico frente al que queríamos generar la respuesta. Tras 14 días los ratones fueron infectados con el virus Δ B8R. Este procedimiento se probó con las líneas de CTL frente a A8R189, D1R282, L2R61, A8R70, F5L, F13L, A38L y E8R. Sólo se obtuvieron líneas específicas para 4 epítomos: A8R189, A8R70, F13L y A38L.

En la médula ósea se acumulan linfocitos T CD8⁺ de memoria (Becker y col. 2005), por lo que nos propusimos generar líneas específicas de CTL a partir de células derivadas de médula ósea obtenidas de ratones infectados con WR o Δ B8R y que estaban en un estado de memoria tras una infección secundaria. Se obtuvieron líneas de CTL para A8R189, J3R y L2R53 altamente específicas y sensibles. Sin embargo, este procedimiento no fue reproducible.

5.3.3. Reconocimiento de células infectadas por líneas de CTL específicas frente a epítomos de VACV derivadas de ratones C57BL/6.

El siguiente objetivo fue determinar si estos epítomos se presentan en las BMDC TAP⁻ infectadas con VACV. Se realizaron ensayos *in vitro* de presentación de antígeno en los que se enfrentaron BMDC TAP⁺ o TAP⁻ infectadas con VACV con cada una de las líneas de CTL generadas de ratones C57BL/6.

En la Figura 22 se representa el porcentaje de activación frente a ambos tipos de BMDC infectadas de una línea monoespecífica de CTL representativa para cada uno de los 27 epítomos. Todas las líneas de CTL reconocían el epítomo en BMDC TAP⁺ infectadas y 8 líneas de CTL (A8R189, A6L, L2R53, A19L, J3R, F5L, F13L y A38L,) eran capaces además de reconocer el epítomo en BMDC sin TAP infectadas. El nivel de activación de las líneas de CTL A8R189, A6L, L2R53, A19L, J3R y A38L era mayor cuando se cocultivaban con BMDC silvestres infectadas que cuando se enfrentaban a células infectadas que no tienen TAP. Esta observación podría indicar que estos 6 epítomos siguen 2 vías de procesamiento en las BMDC, una vía dependiente del transportador y otra vía que no requiere de TAP. Sin embargo, las líneas de CTL F5L y F13L se activaron al mismo nivel en respuesta a ambos tipos celulares, aunque el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ activados era menor del 20%. Por tanto, para estos dos epítomos que se procesan por una vía independiente de TAP no tenemos evidencia de que también sigan una vía dependiente de TAP.

Los péptidos G8R, A23R y A25L habían sido reconocidos *ex vivo* por linfocitos T CD8⁺ de ratones deficientes en TAP (Figura 19). Sin embargo, las correspondientes líneas de CTL generadas en ratones C57BL/6 no se activaron cuando se cocultivaron con las BMDC infectadas TAP⁻, quizá porque también se activaban menos de un 20% en respuesta a BMDC silvestres infectadas. En los ensayos de ICS *ex vivo* se utilizaron concentraciones de péptido sintético en exceso (10^{-6} M). El hecho de que estas líneas de CTL reconozcan débilmente a las células TAP⁺ infectadas podría deberse a que en ellas se presente una cantidad muy limitante del epítomo, que podría ser aun más baja en el caso de las BMDC TAP⁻ infectadas si el epítomo se procesase por 2 vías.

Estos resultados indican más fuertemente que al menos 8 epítomos virales son procesados por vías independientes de TAP, se unen a moléculas de MHC de clase I y se presentan en la superficie de células infectadas a linfocitos T CD8⁺.

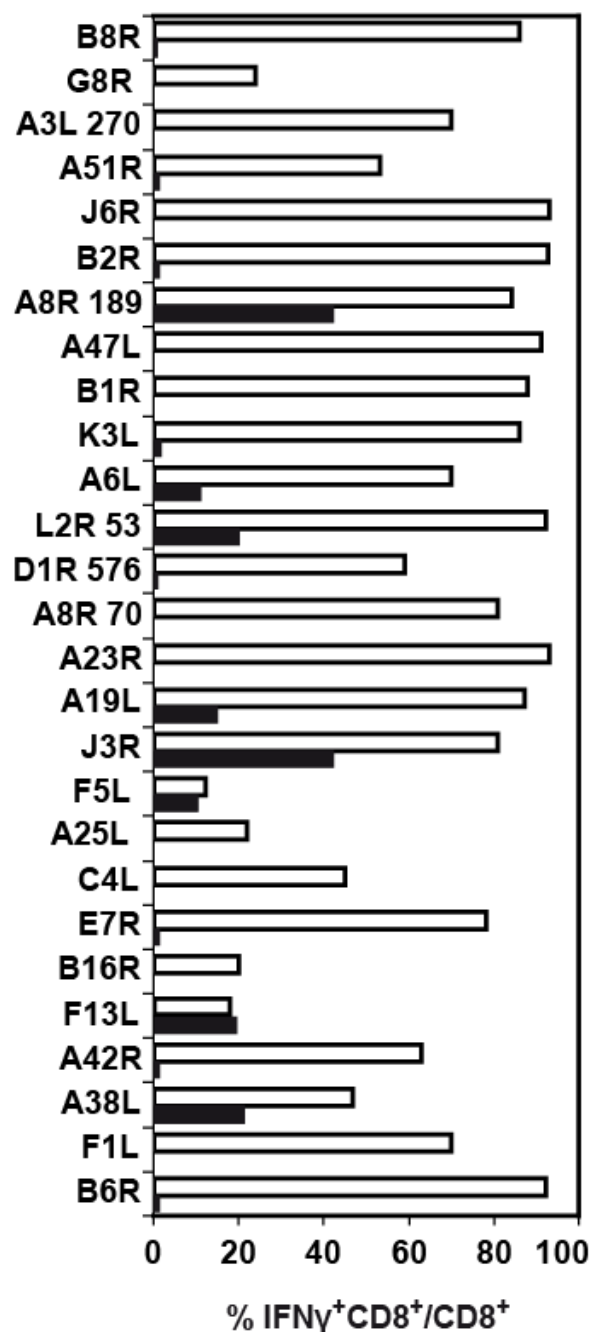


Figura 22. Las líneas de CTL derivadas de ratones C57BL/6 reconocen BMDC infectadas con VACV.

Las líneas de CTL monoespecíficas y policlonales derivadas del bazo de ratones C57BL/6 se estimularon con BMDC TAP⁺ (blanco) o TAP⁻ (negro) infectadas con VACV. La activación de los linfocitos T CD8⁺ se midió mediante la producción de IFN γ mediante ICS. Se muestra el porcentaje de activación de una línea de CTL representativa de cada epítomo.

5.3.4. Establecimiento *in vitro* de líneas de CTL específicas frente a epítomos de VACV derivadas de ratones deficientes en TAP y reconocimiento de BMDC infectadas.

Hemos mostrado que tras la infección los ratones deficientes en TAP generan linfocitos T CD8⁺ específicos frente a antígenos de VACV y que reconocen células infectadas por el virus (Figura 11 y Figura 19). Para estudiar la presentación antigénica de estos antígenos individuales en células infectadas *in vitro*, intentamos generar líneas de CTL específicas derivadas de los ratones deficientes en TAP para cada uno de los epítomos reconocidos en los ensayos *ex vivo* (excepto para el epítomo A25L). A partir de esplenocitos de ratones deficientes en TAP infectados con WR y que se encontraban en un estado de memoria conseguimos generar líneas de CTL específicas para 7 de los 11 epítomos probados: A8R189, L2R53, A19L, J3R, F13L y A38L y además se consiguió generar por primera vez una línea específica frente a E8R. Todas las líneas se generaron al menos 2 veces para cada epítomo aunque no se trabajó en la optimización de la concentración de péptido. No conseguimos establecer ninguna línea para los epítomos G8R, A6L, A23R y F5L, hecho que no podemos explicar. Algunas líneas de CTL se obtuvieron también mediante otras condiciones de inmunización u órgano de origen (Tabla 7).

Epítomo	Agente de la primera inmunización	Estado ^a	Órgano de origen ^b	Concentración de péptido ^c
A19L (47-55)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁸ M
A38L (203-210)	WR / mDC-A38L	memoria / aguda 2 ^a	Bazo	10 ⁻⁸ M
A8R (189-196)	WR / mDC-A8R	memoria / aguda 2 ^a	Bazo o médula ósea	10 ⁻⁸ M
E8R (141-150)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁸ M
F13L (307-315)	WR / mDC-F13L	memoria / aguda 2 ^a	Bazo	10 ⁻⁸ M
J3R (289-296)	WR	memoria	Bazo o médula ósea	10 ⁻⁸ M
L2R (53-61)	WR	memoria	Bazo	10 ⁻⁸ M

Tabla 7. Líneas de CTL derivadas de ratones deficientes en TAP.

Las líneas de CTL monoespecíficas se nombraron como el epítomo frente al cual se generan. El agente utilizado en la mayoría de las inmunizaciones secundarias fue ΔB8R. ^a La respuesta aguda (2^a) se refiere a 6 d.p.i. tras la segunda infección y la de memoria se refiere a 3 semanas tras la segunda infección. ^b Las líneas derivadas de células de médula ósea proceden siempre de un estado de memoria tras la infección secundaria. ^c Se indica la concentración de péptido utilizada durante la reestimulación.

Se determinó mediante ICS la producción de IFN γ tras la estimulación de las líneas de CTL con BMDC incubadas con su péptido sintético 10^{-8} M o con un control (datos no mostrados) y se comprobó que todas las poblaciones de CTL eran totalmente específicas para el péptido frente al que se generaron. Para estudiar si estas líneas reconocían el antígeno viral en células infectadas, se enfrentó cada línea de CTL de ratones deficientes en TAP a BMDC TAP $^{-}$ infectadas con VACV y se analizó la producción de IFN γ como medida de la activación. Las 7 líneas de CTL derivadas de ratones deficientes en TAP reconocían su epítipo viral en las células TAP $^{-}$ infectadas (Figura 23). Este resultado indica que al menos para estos 7 péptidos la cantidad de epítipo viral que se procesa y presenta en las células TAP $^{-}$ infectadas es suficiente para activar a los linfocitos T CD8 $^{+}$ deficientes en TAP. Parece detectarse una fuerte tendencia a una mayor activación de la línea de CTL por los péptidos más hidrofóbicos (datos no mostrados). Aunque es ya muy improbable, dada la evidencia acumulada para estos epítipos, no se excluye la posibilidad de que en alguno de los casos el reconocimiento de las células infectadas por las líneas de CTL específicas de péptido sea resultado de una reacción cruzada.

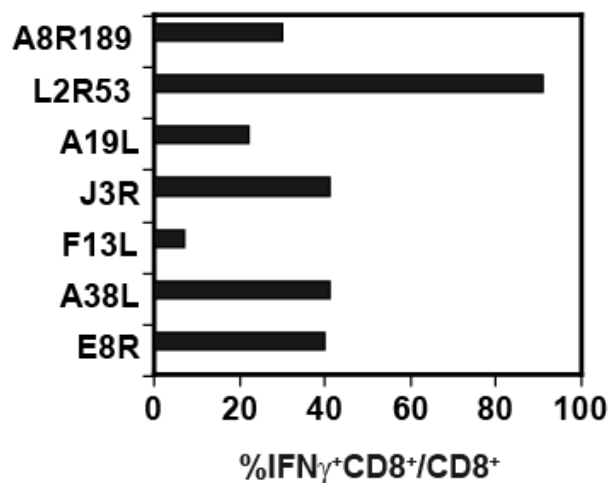


Figura 23. Las líneas de CTL derivadas de ratones deficientes en TAP reconocen BMDC TAP $^{-}$ infectadas con VACV.

Las líneas de CTL monoespecíficas y policlonales derivadas del bazo de ratones deficientes en TAP se estimularon con BMDC TAP $^{-}$ infectadas con VACV. En la gráfica se representa el porcentaje de linfocitos T CD8 $^{+}$ activados que producen IFN γ . Se muestran los datos de una línea representativa de cada epítipo.

Además, la generación a partir de ratones deficientes en TAP, empleando péptidos individuales, de líneas de CTL que reconocen BMDC TAP $^{-}$ infectadas en cultivo, confirma que en los ratones deficientes en TAP e infectados existe efectivamente una presentación independiente de TAP de antígenos virales capaz de activar a linfocitos T CD8 $^{+}$ vírgenes.

Por tanto, en conclusión, de los 12 epítomos virales independientes de TAP, la evidencia más fuerte es para 7 de ellos: J3R, L2R53, A38L, A8R189, A19L, F13L y E8R, pues, además de manifestarse como independientes de TAP en los otros ensayos, incluso se generan líneas de CTL a partir de ratones deficientes en TAP que reconocen a células TAP⁻ infectadas (Figura 23). Para dos de los 12 epítomos, F5L y A6L, la evidencia es también importante, pues las líneas de CTL generadas en ratones silvestres reconocen a células TAP⁻ infectadas (Figura 22). Por último, para 3 de los epítomos, G8R, A25L y A23R, la evidencia se basa sólo en la detección *ex vivo* de linfocitos T CD8⁺ específicos a partir de ratones deficientes en TAP e infectados (Figura 19).

5.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO DE LOS EPÍTOMOS DE VACV.

5.4.1. Papel global del proteasoma en el procesamiento antigénico en células infectadas por VACV.

En la vía clásica, los péptidos antigénicos derivan del procesamiento por el proteasoma en el citosol de proteínas endógenas. Los productos del proteasoma, que pueden incluir epítomos o sus precursores, son transportados al RE a través de TAP.

Hemos demostrado que un 13% de los linfocitos T CD8⁺ de ratones silvestres infectados se activan por antígenos cuyo procesamiento y presentación en la superficie celular no dependen de TAP como mecanismo para acceder a la vía secretoria. Con el objetivo de caracterizar la contribución del proteasoma en el procesamiento de los antígenos de VACV, se realizaron ensayos de cuantificación como los descritos en el apartado 5.2.3 (Figura 16). Se analizó la respuesta de linfocitos T CD8⁺ purificados frente a BMDC TAP⁺ infectadas en presencia o ausencia del inhibidor LC (Figura 24). El VACV que se utilizó fue el recombinante sC-OvaΔC que presenta el epítomo SIINFELK de la Ova de forma independiente de TAP y de proteasoma (Medina y col. 2009) y, que sirve por tanto de control interno (datos no mostrados).

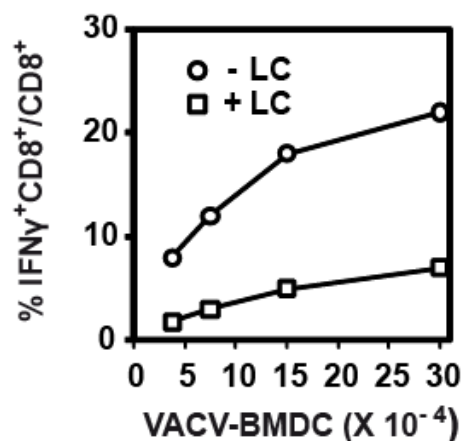


Figura 24. La LC inhibe la presentación de antígenos de VACV en BMDC TAP⁺.

Los linfocitos T CD8⁺ purificados derivados de ratones C57BL/6 infectados con sC-OvaΔC (7 d.p.i.), se estimularon con diferentes cantidades de BMDC TAP⁺ infectadas en presencia o ausencia de LC. La activación de los linfocitos T CD8⁺ se cuantificó mediante ICS. Se controló con CTL específicos que la LC bloqueaba al proteasoma e inhibía un 65% la presentación del antígeno B8R en las mismas células infectadas. El posible efecto tóxico de la LC provoca un 21% de inhibición de la presentación del péptido SIINFEKL en las mismas células infectadas. Datos de un ensayo.

Comparando porcentualmente los datos de la Figura 24 se estimó una reducción del 70% en la activación de los linfocitos T CD8⁺ frente a antígenos de VACV en presencia de LC. Aproximadamente el 40% de los epítomos de VACV en H-2^b proceden de proteínas que se expresan en la fase intermedia o tardía de la infección (Yang y col. 2011), cuya síntesis se bloquea por la LC (Satheshkumar y col. 2009; Teale y col. 2009) Por lo tanto, la presentación de estos epítomos se inhibiría de una forma no relacionada con el efecto directo de la LC sobre el proteasoma. Por otra parte, los inhibidores del proteasoma no son 100 % eficaces, ni *in vitro* (Garcia-Medel y col. 2011) ni en nuestras condiciones en cultivo celular donde la LC tiene una eficacia estimada de un 75% (Tabla 8A). Teniendo en cuenta estas dos consideraciones, los datos de la Figura 24 sugieren que existe una fuerte contribución del proteasoma, que así sería la principal proteasa en el procesamiento de los antígenos tempranos del virus VACV. Sin embargo, estos datos también sugieren que podría haber linfocitos T CD8⁺ que reconozcan antígenos tempranos resistentes a este tratamiento con LC.

5.4.2. Papel global de la TPPII en el procesamiento antigénico en células infectadas por VACV.

Quisimos estudiar si la TPPII, otra proteasa citosólica, participaba en el procesamiento de los antígenos virales resistentes a LC. Se realizaron ensayos de presentación de antígeno estimulando a los linfocitos T CD8⁺ purificados de ratones

C57BL/6 infectados con VACV 7 días antes con cantidades decrecientes de BMDC infectadas derivadas de ratones deficientes en TPPII (Firat y col. 2007) o de ratones silvestres. La activación de los linfocitos T $CD8^+$ fue similar con ambos tipos de dianas (Figura 25). Los mismos ensayos se realizaron en presencia de LC y tampoco observamos un efecto de la TPPII en el procesamiento de antígenos de VACV en ausencia del proteasoma. Aunque parece que la ausencia de TPPII pudiese favorecer ligeramente la presentación de los antígenos, lo que implicaría un papel destructor de la proteasa, las diferencias no son significativas. Por tanto, no tenemos evidencia de que la TPPII tenga un papel en el procesamiento de los antígenos del virus VACV.

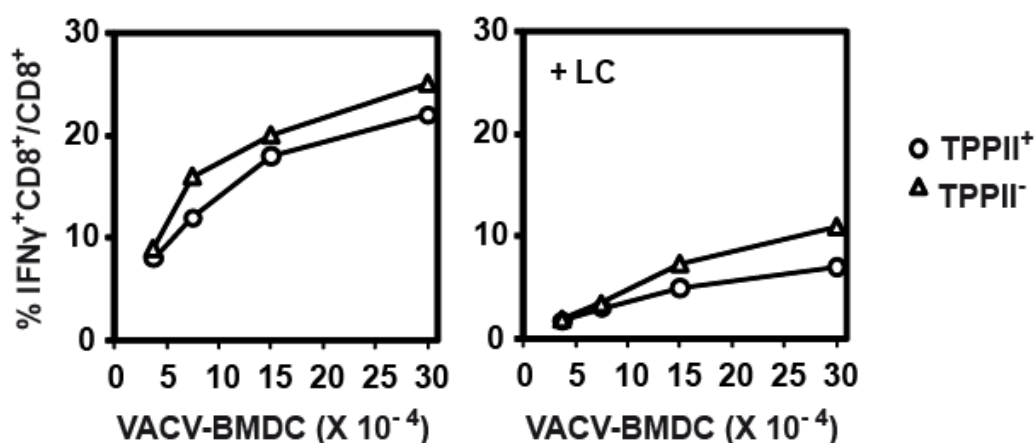


Figura 25. La TPPII no participa en el procesamiento de antígenos de VACV.

Los linfocitos T $CD8^+$ purificados derivados de ratones C57BL/6 infectados con sC-Ova Δ C (7 d.p.i.), se estimularon con distintas cantidades de BMDC silvestres (círculos) o deficiente en TPPII (triángulos) infectadas con sC-Ova Δ C en ausencia (izquierda) o presencia de LC (derecha). Se analizó la respuesta de los linfocitos T $CD8^+$ midiendo la producción de IFN γ por ICS. Se representa el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ activados. Los datos son media de 2 experimentos independientes.

5.4.3. Identificación y análisis de los epítomos de VACV resistentes a LC.

Una fracción de los linfocitos T $CD8^+$ se activan por vías resistentes al tratamiento con LC (Figura 24) y quisimos identificar los epítomos de VACV que reconocen. Para ello se realizaron ensayos de presentación antigénica a líneas de CTL monoespecíficas utilizando BMDC silvestres infectadas en presencia o ausencia del inhibidor LC. Como control de inhibición por LC se analizó la presentación del epítopo SIINFEKL de Ova en células silvestres infectadas con el virus que expresa la construcción cC-Ova a una línea

de CTL específica de este epítipo. En esta construcción, el epítipo se presenta de forma dependiente de TAP y es procesado por el proteasoma (Medina y col. 2009). Además, como controles adicionales, analizamos 6 epítopos derivados de proteínas que se expresan en la fase intermedia de la infección, cuya síntesis bloquea la LC (Tabla 8A). La inhibición media de estos 6 epítopos intermedios en nuestras condiciones en cultivo celular fue alrededor del 75%, de acuerdo con datos *in vitro* que muestran que los inhibidores del proteasoma no bloquean totalmente su actividad (García-Medel y col. 2011). La inhibición mínima fue del 40%, valor que establecimos como umbral para definir la sensibilidad a LC en nuestro sistema.

A continuación analizamos el efecto de la LC en la presentación de 15 epítopos tempranos, entre los que había 3 independientes de TAP (Tabla 8B) y 12 epítopos que requieren de la presencia de TAP para su presentación. La presentación de los 3 epítopos analizados independientes de TAP y de expresión temprana, A8R189, L2R53, y A23R, se bloqueó en presencia de LC, lo que implica la participación del proteasoma. Como hemos comentado anteriormente, en las células silvestres infectadas estos 3 epítopos parecen presentarse por 2 vías; una dependiente y otra independiente de TAP. En presencia de LC, la presentación se bloquea fuertemente sugiriendo que el proteasoma podría actuar en ambas vías. Esta conclusión se reforzó cuando se analizó posteriormente la implicación del proteasoma exclusivamente en la vía de presentación independiente de TAP de estos epítopos (ver apartado 5.4.4). Futuros experimentos añadiendo la LC a 4 h tras la adsorción viral, cuando ya ha tenido lugar la expresión de las proteínas intermedias o tardías de VACV, permitirá aclarar la sensibilidad o resistencia de estas últimas a LC.

De los 12 epítopos dependientes de TAP y de expresión temprana, identificamos 9 epítopos cuya presentación se inhibía en presencia de LC, indicando que siguen una vía clásica de presentación de antígeno dependiente del proteasoma y de TAP. Los dos epítopos analizados de la misma proteína, A8, fueron ambos sensibles a LC.

A				
Epítomos	% Inhibición	Efecto de LC	Expresión temporal	iTAP
A19L*	61 ± 2	S	I	x
A38L	95 ± 5	S	I	x
A3L	83 ± 4	S	I	
A42R	40 ± 3	S	I	
A6L*	80 ± 16	S	I	x
E7R	86 ± 13	S	I	
B				
Epítomos	% Inhibición	Efecto de LC	Expresión temporal	iTAP
A23R*	62 ± 13	S	E	x
A47L	63 ± 8	S	E	
A51R	24 ± 5	R	E	
A8R189*	77 ± 8	S	E	x
A8R70	88 ± 8	S	E	
B1R	86	S	E	
B2R	-159 ± 39	R/PT	E	
B6R	66 ± 7	S	E	
B8R	85 ± 4	S	E	
C4L	76	S	E	
D1R578	11 ± 6	R	E	
F1L	99	S	E	
J6R	41 ± 5	S	E	
K3L	81 ± 8	S	E	
L2R53*	83 ± 5	S	E	x
SIINFEKL (cC-Ova)	96 ± 1	S	E	

Tabla 8. Efecto de la LC en la presentación a CTL de epítomos individuales de VACV de expresión post-replicativa (A) o temprana (B) en BMDC TAP⁺.

Se realizaron ensayos de presentación antigénica a CTL utilizando BMDC silvestres incubadas o no con LC e infectadas con el virus cC-Ova. Se indica el porcentaje de inhibición de la presentación de cada uno de los epítomos analizados como la media ± SEM en 2-6 experimentos. La presentación de los epítomos se consideró como sensible (S) cuando la inhibición por LC fue > 40%, como resistente (R) si fue menor de este valor, y como potenciada (PT) si fue negativa. Se somborean en gris los epítomos R y PT. Expresión temporal: intermedia (I) o temprana (E). *Todos los epítomos independientes de TAP (iTAP), salvo A38L, podrían seguir también una vía de procesamiento dependiente de TAP, según se sugiere de los datos de la Figura 22.

Además, identificamos 3 epítomos dependientes de TAP y tempranos, cuyo procesamiento en las BMDC silvestres infectadas era resistente a LC: A51R, B2R y D1R578. Incluso, la presentación del epítopo B2R por D^b se potenciaba 2,5 veces en presencia de LC. Esto podría indicar que este epítopo es destruido en parte por el proteasoma. Estos epítomos que no son inhibidos por LC podrían ser procesados por

otras proteasas citosólicas, distintas del proteasoma. Anteriormente hemos demostrado que la TPPII no tenía un papel detectable en la presentación global de antígenos de VACV (Figura 25) pero quisimos analizar si participaba en el procesamiento concreto de estos 3 epítomos tempranos y dependientes de TAP que no se inhibían por LC. Se realizaron ensayos de presentación de antígeno *in vitro* estimulando las líneas de CTL correspondientes con BMDC derivadas de ratones silvestres o deficientes en TPPII e infectadas, llevando como control los CTL frente a SIINFEKL y B8R (Figura 26). No se observaron diferencias en la activación de los CTL tras enfrentarse a ambos tipos de BMDC infectadas. Así, la presencia o ausencia de TPPII no tiene ningún efecto en la presentación de estos epítomos a CTL. Concluimos que la generación de los epítomos A51R, B2R y D1R578 probablemente no requiera ni del proteasoma ni de la peptidasa TPPII, lo que implica que su procesamiento puede depender de otras peptidasas.

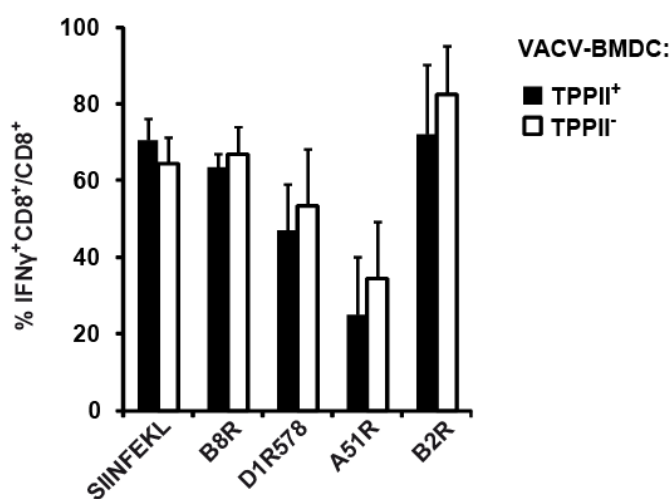


Figura 26. La TPPII no es necesaria para el procesamiento de los epítomos resistentes a LC: B2R, D1R578 y A51R.

Las líneas de CTL específicas se estimularon con BMDC silvestres (negro) o deficientes en TPPII (blanco) infectadas con sC-OvaΔC. Mediante ICS se determinó la producción de IFN γ por los linfocitos T CD8⁺ como medida de la activación. En la grafica se representa el valor promedio y el error del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ activados de 2 ensayos independientes.

5.4.4. Caracterización del procesamiento de los epítomos de VACV independientes de TAP en células deficientes en TAP. Efecto de distintos inhibidores.

En nuestro objetivo de caracterizar la relevancia de las rutas alternativas de presentación de antígeno por MHC de clase I, describimos en el apartado anterior los epítomos que no requieren del proteasoma. Pasamos a continuación a estudiar en más detalle los que no requieren TAP. De los 12 epítomos virales que se presentan de forma independiente de TAP a linfocitos T CD8⁺, establecimos para 9 de ellos líneas de CTL que

reconocían BMDC TAP⁻ infectadas (Figura 22 y Figura 23). Siete de estas líneas específicas que reconocían BMDC TAP⁻ infectadas, J3R, F5L, L2R53, A38L, A8R189, A19L, y A6L nos permitieron iniciar la caracterización de las vías de procesamiento que siguen estos epítomos en las células infectadas. Para analizar la naturaleza endógena o exógena de la presentación independiente de TAP de cada uno de estos epítomos se realizaron ensayos de ICS con BMDC deficientes en TAP, incubadas o no con BFA durante la infección con VACV. Obtuvimos resultados de inhibición por BFA para los 7 epítomos, concluyendo que su presentación independiente de TAP es endógena (Tabla 9).

Para estudiar la implicación del proteasoma en la vía de presentación independiente de TAP de estos epítomos, realizamos ensayos de presentación a CTL con BMDC deficientes en TAP incubadas o no con LC e infectadas con VACV. Como control de no toxicidad del inhibidor, las BMDC TAP⁻ se infectaron con el VACV que expresa la construcción sC-OvaΔC, en la que el epítomo SIINFEKL se presenta a CTL específicos en presencia de LC. Como anteriormente, no se pueden sacar conclusiones del efecto de la LC sobre la presentación de los epítomos intermedios, ya que la LC inhibe la síntesis de sus proteínas de origen. Se observa que la presentación independiente de TAP a CTL específicos de los 6 epítomos analizados se inhibía en presencia de LC, sugiriendo que los epítomos tempranos J3R, L2R53 y A8R189 son procesados por el proteasoma (Tabla 9). Se realizó también un ensayo con otro inhibidor del proteasoma, la epoxomicina, obteniéndose los mismos resultados, además de una inhibición específica de la presentación del epítomo de expresión temprana F5L. Los datos de la Figura 22 sugerían que los epítomos tempranos J3R, L2R53 y A8R189 se presentarían por 2 vías: una vía dependiente de TAP y una vía independiente de TAP. Como explicamos en el apartado 5.4.3, la presentación global de estos 3 epítomos en células con TAP era sensible a LC (Tabla 8B), resultado que confirmamos con estos datos para la vía independiente de TAP de estos epítomos (Tabla 9).

Estos resultados sugieren que al menos 3 epítomos, J3R, L2R53 y A8R189, se presentan de forma endógena por 2 vías: una vía clásica, que depende de TAP y del proteasoma, y otra vía independiente de TAP que también requiere de la participación del proteasoma. En el caso de F5L, podría tratarse de una única vía independiente de TAP y dependiente del proteasoma.

Epítomos	Expresión temporal	BFA		LC		Epoxomicina	
		% Inhibición	Efecto	% Inhibición	Efecto	% Inhibición	Efecto
J3R	E	86 ± 9	S	82 ± 9	S	92	S
F5L	E	95	S	n.d.	n.d.	64	S
L2R53	E	58	S	51 ± 11	S	58	S
A38L	I	99 ± 1	S	82 ± 6	S	n.d.	n.d.
A8R189	E	99 ± 3	S	93 ± 1	S	74	S
A19L	I	85 ± 10	S	87 ± 4	S	n.d.	n.d.
A6L	I	99 ± 2	S	84 ± 1	S	89	S
SIINFEKL sC-OvaΔC	E	82 ± 6	S	10 ± 10	R	6	R

Tabla 9. Efecto de la BFA y de inhibidores del proteasoma en las vías de procesamiento independientes de TAP de epítomos de VACV en BMDC TAP⁺.

Se realizaron ensayos de presentación antigénica a CTL utilizando BMDC TAP⁺ incubadas o no con los distintos inhibidores e infectadas con el virus sC-OvaΔC. Se resume el efecto de cada inhibidor y se indica el porcentaje de inhibición de la presentación de cada uno de los epítomos analizados. Se somborean en gris los resultados con inhibidores del proteasoma de epítomos intermedios por la dificultad de su interpretación. S: Sensible, R: Resistente, n.d.: no determinado, E: Temprano, I: Intermedio.

Para estudiar la participación principal o accesoria de otras proteasas en la vía de procesamiento de los epítomos independientes de TAP realizamos ensayos de presentación a las líneas de CTL de BMDC TAP⁺ infectadas en presencia o ausencia de dos inhibidores, leucintiol, que inhibe metalo-aminopeptidasas (sobre todo de tipo microsomal) y decRVKR-cmk, que inhibe específicamente a la endoproteasa furina localizada en el trans Golgi y a otras proteín-convertasas de la misma familia.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27 y en la Tabla 10 se resume el efecto de cada inhibidor analizado sobre la presentación de cada epítomo. Los 3 epítomos de 8 aa y derivados de proteínas citosólicas analizados, J3R, A8R189 y A6L, requerían del corte por metalo-aminopeptidasas (probablemente microsomales), mientras que ninguno de los 2 epítomos de 9 aa analizados ni ninguno de los 2 epítomos estudiados que derivan de regiones TM de proteínas de membrana las requirieron. Por otro parte, ninguno de los epítomos analizados requirió la furina para su procesamiento. Sin embargo, la presentación a CTL del epítomo A19L derivado de una proteína citosólica aumentó al doble en presencia del inhibidor, lo que podría indicar que la furina favorece su destrucción.

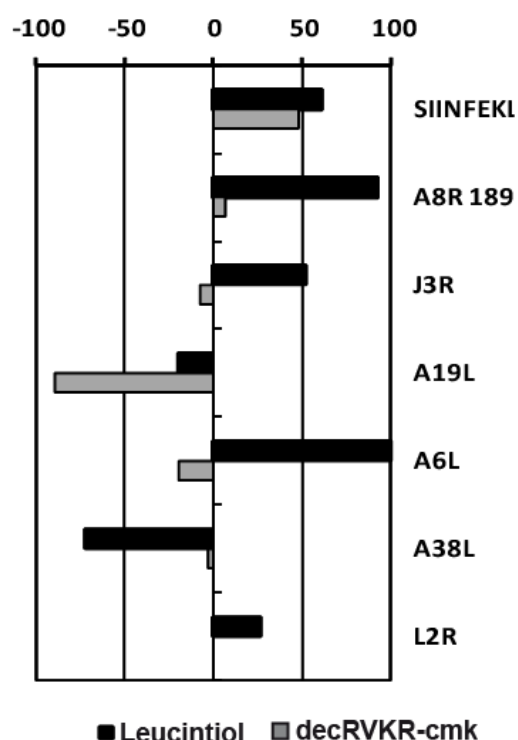


Figura 27. Los epítomos independientes de TAP pueden ser procesados por proteasas distintas del proteasoma.

Se realizaron ensayos de presentación a CTL específicos con BMDC TAP⁺ incubadas con los inhibidores decRVKR-cmk y leucintiol e infectadas con sC-OvaΔC. Se representa el porcentaje de inhibición de la presentación endógena de cada uno de los epítomos analizados. Datos de un ensayo representativo.

Epítomos	Expresión temporal	Número de aa	Localización subcelular	Leucintiol	decRVKR-cmk
J3R	E	8	citoplasma	S	R
F5L	E	9	membrana	n.d.	n.d.
L2R53	E	9	membrana	R	n.d.
A38L	I	8	membrana	R	R
A8R189	E	8	citoplasma	S	R
A19L	I	9	citoplasma	R	PT
A6L	I	8	citoplasma	S	R

Tabla 10. Efecto de distintos inhibidores sobre la presentación independiente de TAP de epítomos de VACV.

S: Sensible, R: Resistente, PT: Potenciado, n.d.; no determinado, E: Temprano, I: Intermedio.

En resumen, de los 12 epítomos que siguen una vía de procesamiento independiente de TAP encontramos que los 7 analizados en mayor detalle (J3R, F5L, L2R53, A38L, A8R189, A19L, y A6L) siguen una vía endógena sensible a BFA, que 2 de ellos requieren la acción del proteasoma (F5L y L2R53), mientras que otros 2 requieren del proteasoma y de metalo-aminopeptidasas probablemente de recorte (J3R y A8R189) y que A19L es probablemente sensible a la acción destructora de proteasas de la familia de la furina.

Epítomos	iTAP	Tipo de proteína	Endógena	Proteasoma	Metalo-aminopeptidasas	Furina
J3R	si	citoplasma	sí	sí	sí	no
G8R	si	membrana				
F5L	si	membrana	sí	sí		
L2R53	si	membrana	sí	sí	no	
A38L	si	membrana	sí		no	no
A8R189	si	citoplasma	sí	sí	sí	no
A19L	si	citoplasma	sí		no	Destructor
A6L	si	citoplasma	sí		sí	no
A25L	si	membrana				
A23R	si	citoplasma		sí*		
F13L	si	citoplasma				
E8R	si	membrana				

Tabla 11. Resumen de las proteasas que pueden participar en el procesamiento de los epítomos independientes de TAP.

iTAP: independiente de TAP. Las casillas vacías indican que no ha sido determinado; en general, se trata de epítomos más subdominantes cuyo análisis es técnicamente más complicado. *Solo se ha comprobado la dependencia del proteasoma en el procesamiento de este epítomo en células TAP⁺.

5.5. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS EPÍTOMOS DE VACV.

Con el objetivo de identificar alguna propiedad intrínseca que pudiese explicar el procesamiento por rutas alternativas de los epítomos de VACV, analizamos diferentes características de las proteínas de VACV estudiadas y de los ligandos de MHC de clase I que derivan de ellas.

5.5.1. Características de las proteínas de origen de los epítomos.

En cuanto a su expresión temporal, en torno al 40% de las proteínas de VACV están reguladas por promotores intermedios o tardíos durante la infección (Yang y col. 2011). En torno al 40% de los ligandos de MHC de clase I derivan de proteínas post-replicas que engloban a las expresadas en la fase intermedia y tardía y el subconjunto de los 30 epítomos que hemos analizado derivan de proteínas de expresión intermedia. Sin embargo, más de la mitad de los epítomos independientes de TAP derivan de proteínas intermedias mientras que los epítomos dependientes de TAP derivan mayoritariamente de proteínas tempranas (Figura 28).

La función de aproximadamente el 30% de las proteínas de VACV es aún desconocida. De todas las proteínas de VACV de las que se conoce su función (Yang y col. 2010; Yang y col. 2011), la mayor parte están asociadas al virión, seguidas en número por las implicadas en regulación viral (factores de transcripción y de replicación del ADN) (Tabla 12 y Figura 28). Las proteínas estructurales contienen significativamente más epítomos de linfocitos T CD8⁺ que otras de tamaño mayor (Diez-Rivero y Reche 2012). Sorprendentemente, a pesar de existir un 25% de proteínas que actúan como factores de virulencia o que interaccionan con el huésped, no hemos encontrado ningún epítomo independiente de TAP derivado de ellas.

	Regulación viral	Interacción con el huésped	Asociación al virión
Total proteínas	44 (31%)	35 (25%)	62 (44%)
Proteínas con epítomos H-2 ^b totales	12 (43%)	6 (21%)	10 (36%)
Proteínas con epítomos H-2 ^b analizados	7 (39%)	4 (22%)	7 (39%)
Epítomos H-2 ^b totales	14 (44%)	6 (19%)	12 (37%)
Epítomos H-2 ^b analizados	9 (43%)	4 (19%)	8 (38%)
Epítomos H-2 ^b iTAP	4 (44%)	0	5 (56%)

Tabla 12. Clasificación de la categoría funcional de las proteínas de VACV.

De los epítomos presentados por H-2^b, se muestra el porcentaje de epítomos totales, analizados, independientes de TAP (iTAP), así como el porcentaje de proteínas que los contienen respecto al total de proteínas de VACV. Hay 2 proteínas que contienen 2 epítomos cada una. Las categorías funcionales “Transcription” y “DNA replication” de la Figura 5A se engloban aquí en la categoría “regulación viral”.

Dos tercios de las proteínas que contienen epítomos presentados por H-2^b analizados son citosólicas mientras que el tercio restante son proteínas de membrana integrales (con regiones TM) o secretadas que pueden acceder al RE co-traduccionalmente. La mitad de los epítomos independientes de TAP derivan de proteínas integrales de membrana (Figura 28). Ninguna de las 2 proteínas secretadas contiene un epítomo independiente de TAP y sólo un 33 % de las proteínas citosólicas dan lugar tras su procesamiento a un epítomo independiente de TAP.

Durante la morfogénesis de VACV existe una gran reorganización de membranas que van a participar en la formación de factorías virales donde tiene lugar la transcripción intermedia y tardía de los genes del virus, la replicación del ADN y el

ensamblaje de los nuevos viriones. La mitad (14) de las proteínas de VACV analizadas se localizan en estas factorías virales (Chung y col. 2006; Resch y col. 2007) y el 75% de los epítomos independientes de TAP derivan de éstas (Tabla 13 y Figura 28).

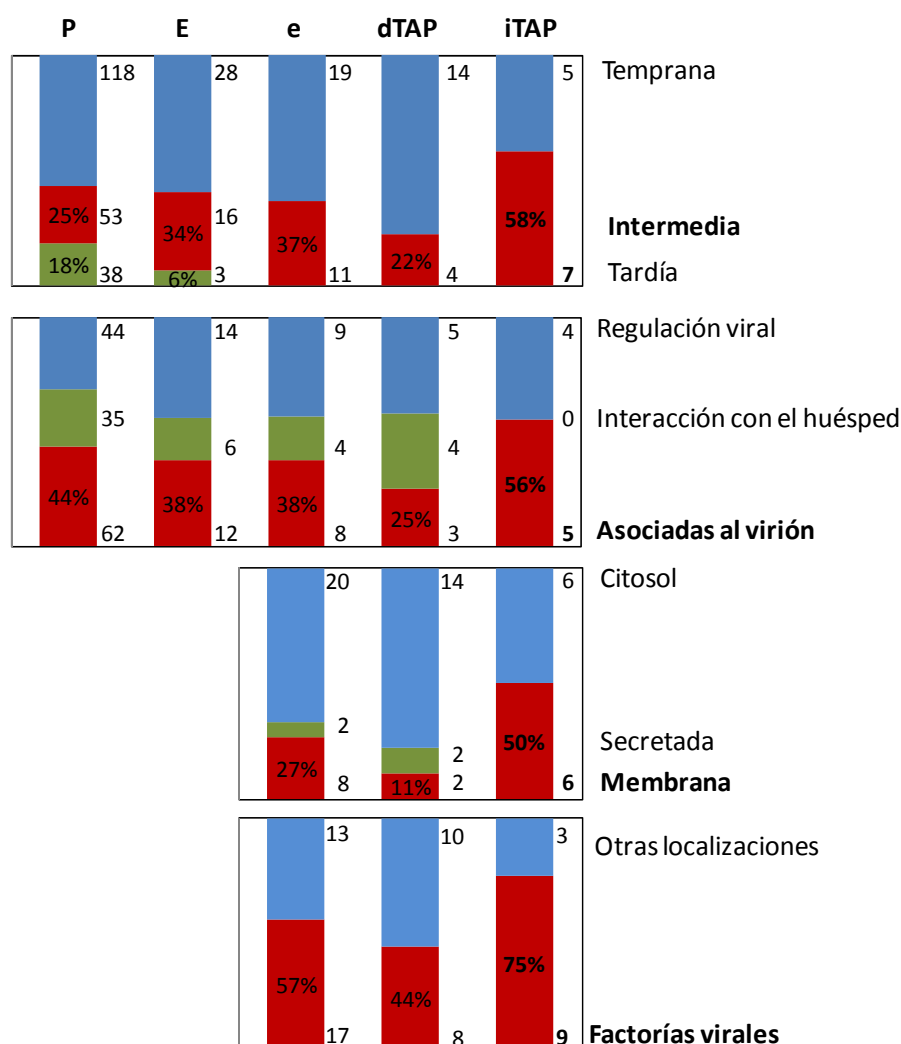


Figura 28. Características de los epítomos de VACV presentados por H-2^b y de las proteínas de las que derivan.

Se clasifican las proteínas y los epítomos en base a su cinética de expresión, su papel en el ciclo de replicación viral, su localización subcelular y su localización durante la morfogénesis. Se analizan proteínas totales de VACV (P), epítomos totales (E), epítomos analizados (e), epítomos dependientes de TAP (dTAP) y epítomos independientes de TAP (iTAP). Cada barra representa de 0% a 100% las distintas características indicadas a la derecha de la figura. Se indica el número de epítomos (a la derecha de las barras) y el porcentaje de algunas categorías (dentro de las barras). Las categorías funcionales “Transcription” y “DNA replication” de la Figura 5A se engloban aquí en la categoría “regulación viral”.

	dTAP	iTAP
Citosol	K3	
Membrana		A38
Secretadas	B8, B16	
Orgánulos	F1	
Factoría viral	A3, A42, B1, D1*, J6	A6, A8*, A19, A23, E8, G8, J3, L2*, A25
Virión extracelular	E7	F13
Desconocida	A47, A51, B2, C4, B6	F5

Tabla 13. Distribución subcelular de las proteínas de VACV de las cuales derivan epítomos estudiados en este trabajo.

Independiente de TAP (iTAP). * Proteínas que además contienen otro epítomo dependiente de TAP (dTAP).

En resumen, mientras que los epítomos analizados constituyen una muestra representativa de los epítomos totales y de las proteínas totales de VACV, existe una marcada diferencia entre los epítomos dependientes e independientes de TAP. Así, la mayor parte de los epítomos dependientes de TAP derivan de proteínas de expresión temprana, con funciones de regulación viral e interacción con el huésped y citosólicas, mientras que la mayoría de los epítomos independientes de TAP derivan de proteínas de expresión post-replicativa, asociadas al virión, de membrana y localizadas en factorías virales.

5.5.2. Hidrofobicidad de los epítomos de VACV.

En primer lugar, analizamos la hidrofobicidad de los 30 epítomos estudiados de VACV (Tabla 23). Como se observa en la Figura 29A, los epítomos independientes de TAP son significativamente más hidrofóbicos que los epítomos que dependen de TAP y que siguen la vía clásica. A pesar de que la molécula de MHC de clase I K^b une péptidos más hidrofóbicos que la molécula D^b , nosotros no hemos observado diferencias entre la hidrofobicidad de los péptidos presentados por K^b y D^b en nuestro subconjunto. Sin embargo, cuando sólo analizamos los epítomos presentados por la molécula H-2 K^b la diferencia de hidrofobicidad es más notable aún entre los epítomos dependientes e independientes de TAP, incluso se observa la misma tendencia, cuando analizamos por separado los epítomos K^b que derivan de proteínas citosólicas y los que derivan de proteínas de membrana (Figura 29B).

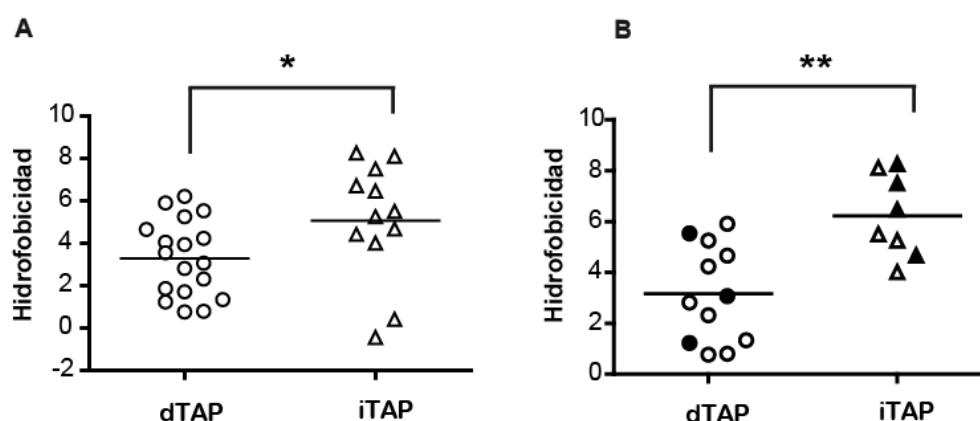


Figura 29. Los epítomos independientes de TAP son más hidrofóbicos que los epítomos dependientes de TAP.

Se indica el índice de hidrofobicidad de los epítomos dependientes de TAP (círculos) e independientes de TAP (triángulos) para el conjunto de los 30 epítomos analizados (A) o sólo aquellos que son presentados por la molécula de MHC de clase I K^b (B). Se resaltan en color negro aquellos epítomos que derivan de proteínas transmembrana o secretorias. La línea horizontal indica el valor promedio de cada grupo.

No se observaron diferencias significativas en la hidrofobicidad de los epítomos localizados en regiones TM o en dominios citosólicos o luminales de la proteína de origen, ni en el conjunto de los 30 epítomos analizados ni en el subconjunto de los 12 independientes de TAP (Figura 30). Por tanto, parece que la hidrofobicidad no depende ni de la molécula de MHC de clase I presentadora ni de la localización del epítopo en la proteína de origen, pero de forma relevante la hidrofobicidad sí parece explicar la independencia de TAP.

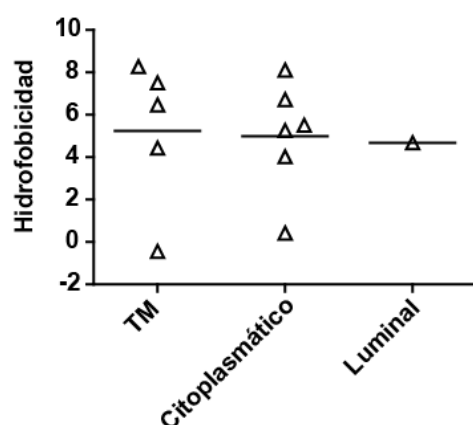


Figura 30. La alta hidrofobicidad de los epítomos independientes de TAP no está relacionada con su localización en la proteína de origen.

Se indica el índice de hidrofobicidad de los epítomos independientes de TAP clasificados según su localización en la proteína de origen. La línea horizontal indica el valor promedio de cada grupo.

No se encontró correlación de la hidrofobicidad de los epítomos con la implicación o no del proteasoma o de otras proteasas (datos no mostrados).

5.5.3. Motivos de anclaje preferenciales a MHC de clase I.

Los 30 epítomos de VACV analizados son presentados por las moléculas de MHC de clase I Kb y Db. Analizamos la proporción de epítomos dependientes e independientes de TAP que se presentan por cada molécula de MHC de clase I y no observamos diferencias entre ambos grupos (Tabla 14).

MHC de clase I	K ^b	D ^b
Dependientes de TAP	12	6
Independientes de TAP	8	4
Total	20	10

Tabla 14. Epítomos de VACV analizados.

Se desglosan según la molécula de H-2^b presentadora y su mecanismo respecto a TAP.

Analizamos los motivos preferenciales de anclaje descritos de los péptidos dependientes e independientes de TAP a la molécula de MHC de clase I Kb y observamos que los epítomos independientes de TAP parecen tener un uso sesgado del residuo de anclaje en la posición carboxilo terminal del péptido (

Tabla 15). Ninguno de los epítomos independientes de TAP tiene V en esta posición mientras que un tercio de los epítomos dependientes de TAP si tienen este residuo. Además en los epítomos independientes de TAP aparecen I y M que no aparecen en los epítomos dependientes de TAP. En cuanto al residuo de anclaje a Kb en posición 5 del péptido, no se observaron diferencias entre los dos grupos de epítomos (

Tabla 15). No se observó tampoco ninguna tendencia a un uso diferencial de motivos de anclaje a Db en función de la dependencia de TAP (

Tabla 15).

Empleando los algoritmos de predicción de epítomos SYFPEITHI y BIMAS calculamos la puntuación de los epítomos dependientes e independientes de TAP y no encontramos diferencias significativas entre sus puntuaciones promedio ni para Kb ni para Db (datos no mostrados), al contrario de lo encontrado para las moléculas HLA-A2 y HLA-B51 (Weinzierl y col. 2008).

MHC de clase I	K ^b (n=20)				D ^b (n=10)			
Residuo carboxilo preferencial	L	V	I	M	I	L	M	V
Dependientes de TAP	8	4	0	0	3	1	1	1
Independientes de TAP	5	0	2	1	2	2	0	0
Total	13	4	2	1	5	3	1	1

MHC de clase I	K ^b (n=20)			D ^b (n=10)		
Residuo preferencial en posición 5	F	Y	otros	N	S	I
Dependientes de TAP	7	4	1	3	2	1
Independientes de TAP	5	3	0	4	0	0
Total	12	7	1	7	2	1

Tabla 15. Motivos de anclaje preferenciales de los epítomos de VACV a las moléculas H-2 K^b y D^b.

Se muestra el número de epítomos de VACV analizados que tienen los residuos preferenciales de anclaje a las moléculas de H-2^b en las posiciones carboxilo y 5 de la secuencia.

5.5.4. Localización de los epítomos en las proteínas de origen.

De las 9 proteínas de membrana analizadas, 7 son integrales de membrana y 2 son secretadas, pero no hemos identificado ningún epítomo independiente de TAP que derive de ninguna de las 2 proteínas secretadas estudiadas. De las 7 proteínas integrales de membrana derivan 8 epítomos. De ellos, sólo 2 no son independientes de TAP; uno es el epítomo L2R61 que tiene 3 aa localizados en la región TM de la proteína y el resto en un lazo luminal de ésta (L. Maruri-Avidal, comunicación personal); la otra excepción es el epítomo B6R, localizado en el dominio citosólico de una proteína de membrana. Los restantes 6 epítomos derivados de proteínas integrales de membrana son independientes de TAP, de los cuales 5 (G8R, F5L, L2R53, A38L, E8R) tienen un número variable de aa localizados en alguna región TM de la proteína y sólo uno, el epítomo A25L, se localiza en la región luminal de la proteína (Tabla 16 y Figura 31). Por tanto, existe una marcada tendencia a que los epítomos derivados de proteínas integrales de membrana deriven de regiones TM y sean presentados de forma independiente de TAP (Figura 32).

	Dominio citosólico	Dominio TM	Dominio luminal	Total
Epítomos H-2 ^b analizados	21	6	3	30
Epítomos H-2 ^b dTAP	15	1	2	18
Epítomos H-2 ^b iTAP	6 (29%)	5 (83%)	1	12

Tabla 16. Localización del epítopo en la proteína de origen.

Se muestra el número de epítomos presentados por H-2^b analizados, de epítomos dependientes de TAP (dTAP), y de epítomos independientes de TAP (iTAP) y su localización en los dominios de la proteína de origen. De los epítomos que derivan del dominio citosólico o TM de su proteína de origen, se indica en cada caso el porcentaje que son iTAP (independientes de TAP).

Estos resultados podrían indicar la existencia de algún mecanismo (distinto de la hidrofobicidad de los epítomos (Figura 30)), que favoreciese el procesamiento alternativo a TAP de proteínas con acceso a la vía secretoria o de sus epítomos localizados en regiones TM y no en el dominio luminal.

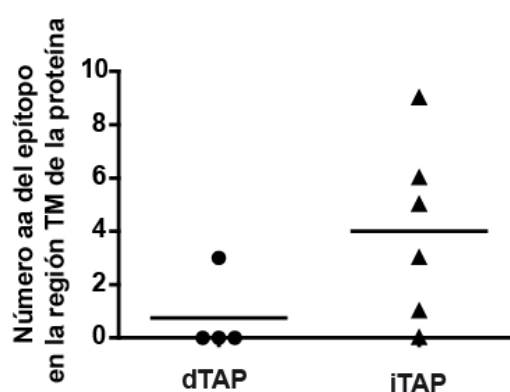


Figura 31. La mayoría de los epítomos que derivan de regiones TM de la proteína de origen son independientes de TAP.

Se muestra el número de aa localizados en la región TM de proteínas integrales o secretadas de los epítomos dependientes de TAP (dTAP) o independientes de TAP (iTAP).

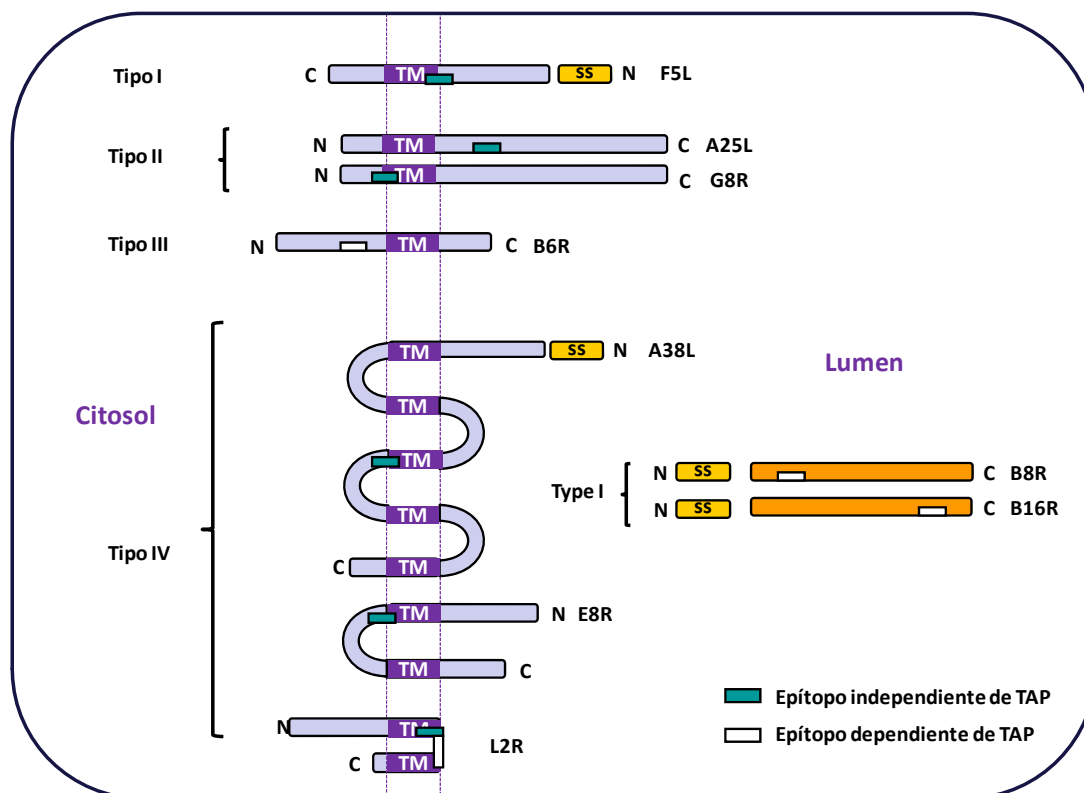


Figura 32. Localización de los epítomos en las proteínas de membrana de VACV.

Se muestra la orientación más probable de las proteínas de membrana de VACV y la localización de las regiones TM. Se representa la posición de los epítomos independientes de TAP (verde) o dependientes de TAP (blanco) en la proteína de origen.

5.5.5. Características de los epítomos de VACV independientes de TAP asociadas a la inmunodominancia en ratones deficientes en TAP.

Observamos una correlación significativa entre el orden de la puntuación de los epítomos independientes de TAP empleando el algoritmo SYFPEITHI y la jerarquía de inmunodominancia de los epítomos presentados por K^b en los ratones C57BL/6 (Figura 33), así como entre la puntuación BIMAS y la jerarquía de inmunodominancia de los epítomos presentados por D^b en los ratones deficientes en TAP (Figura 34). Sin embargo, la significancia biológica de estas dos correlaciones es cuestionable, ya que no hay correlación en ninguna de las otras posibles combinaciones.

En segundo lugar, indicamos los factores que apuntaban una asociación con la inmunodominancia en animales deficientes en TAP. Las tendencias no fueron estadísticamente significativas, posiblemente por el pequeño tamaño muestral, pero se detallan por su posible interés para estudios con un mayor número de péptidos (Figura 35);

- Parece existir una tendencia a que los epítomos presentados por D^b sean menos dominantes que los presentados por K^b.
- Curiosamente, los 5 epítomos que presentan F como residuo en la posición 5 de anclaje a K^b son más hidrofóbicos y más inmunodominantes en el ratón deficiente en TAP que el resto que poseen Y en dicha posición. No ocurre lo mismo con el conjunto de los epítomos reconocidos por los ratones silvestres.

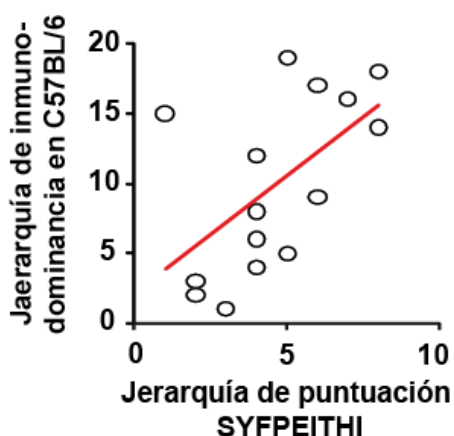


Figura 33. La inmunodominancia en ratones C57BL/6 de los epítomos presentados por K^b correlaciona con su adecuación al motivo definido por el algoritmo SYFPEITHI.
p=0,03

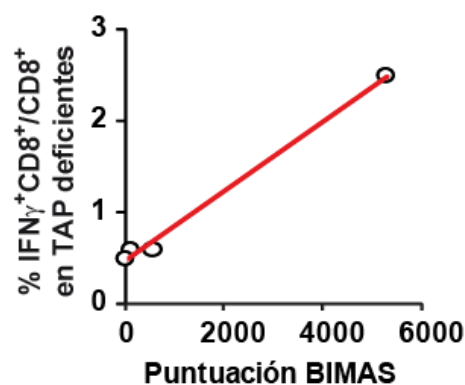


Figura 34. La respuesta de linfocitos T CD8⁺ en ratones deficientes en TAP frente a los epítomos presentados por D^b correlaciona con la puntuación BIMAS.
p=0,003

Por último, el análisis de diversos factores de los epítomos independientes de TAP nos indicó que ninguno de ellos correlacionaba en absoluto con la inmunodominancia ni en ratones C57BL/6 ni en ratones deficientes en TAP. Se trata de los siguientes factores:

- Localización subcelular de la proteína de la que deriva el epítomo.
- Cinética de expresión temporal de la proteína de la que deriva el epítomo.

- Categoría funcional de la proteína de la que deriva el epítipo.
- Localización en factorías virales de la proteína de la que deriva el epítipo.
- Número de regiones TM de la proteína de la que derivan los epítipos.
- Número de aa del epítipo localizados en regiones TM de la proteína de origen.
- Tamaño del epítipo
- Hidrofobicidad del epítipo

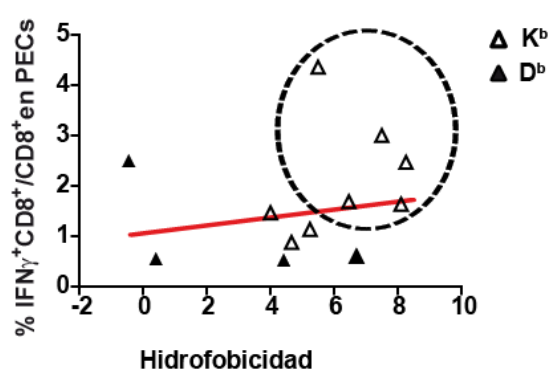


Figura 35. Análisis de correlación entre la hidrofobicidad y la inmunodominancia en ratones deficientes en TAP.

Análisis de correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN γ cuando son activados por cada uno de los epítipos independientes de TAP y su correspondiente valor de hidrofobicidad. El círculo señala los epítipos presentados por K^b que tienen F en posición 5.

5.6. ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE Y DEL CONTROL DE LA INFECCIÓN POR VACV TRAS LA VACUNACIÓN EN EL MODELO MURINO DEFICIENTE EN TAP.

5.6.1. La inmunización con dos péptidos que se presentan de forma independiente de TAP aumentó la respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ frente a una infección posterior con VACV de ratones C57BL/6 o deficientes en TAP.

Los mecanismos exactos por los cuales la vacuna de la viruela funcionó no se han aclarado aún. Sin embargo, los linfocitos T CD8⁺ de memoria pueden tener un papel en la protección frente a la infección por VACV (Xu y col. 2004). Queríamos estudiar si los epítipos que accedían a vías independientes de TAP y activaban linfocitos T CD8⁺ inducían una respuesta protectora independiente de TAP frente a la infección por VACV. La infección por VACV inducía una respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ frente a varios epítipos virales en ratones deficientes en TAP (Figura 20). De los 12 epítipos descritos en esta tesis elegimos 2 epítipos representativos para los ensayos de

vacunación: A8R189, derivado de un factor de transcripción temprano citosólico y A38L, derivado de parte de la zona TM de una glicoproteína de membrana que se expresa de forma intermedia. Respecto a la inmunodominancia en los ratones deficientes en TAP, estos epítomos se localizan en una posición intermedia (Figura 21) y tampoco destacan por su hidrofobicidad (Tabla 23).

Ratones silvestres o deficientes en TAP fueron vacunados mediante procedimientos ya descritos (Badovinac y col. 2005) con BMDC maduras en presencia de LPS e incubadas con los péptidos A8R189 y A38L. Tras 14 días los animales se infectaron i.p. con VACV. A los 6 días se sacrificaron y se analizó en el bazo la respuesta secundaria, midiendo la producción de IFN γ de los linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos frente a A8R189 y A38L. La vacunación previa con los péptidos indujo linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos para estos epítomos (datos no mostrados), que además se potenciaron tras la infección con el virus (Figura 36). La frecuencia de linfocitos T CD8 $^{+}$ específicos para estos epítomos aumentó 8-12 veces en los ratones deficientes en TAP vacunados respecto a la respuesta primaria frente a VACV de los animales no vacunados, de manera similar o superior a lo obtenido en ratones silvestres.

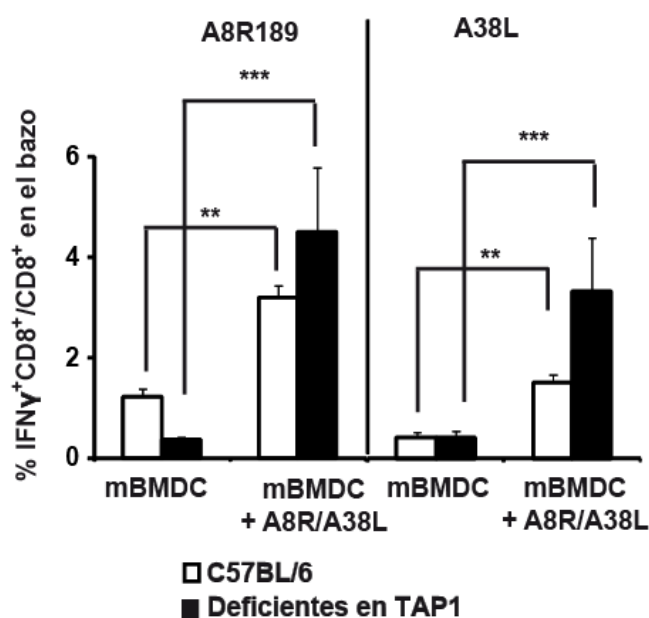


Figura 36. La vacunación con los epítomos A8R189 y A38L induce una respuesta de linfocitos T CD8 $^{+}$ de memoria frente a la infección por VACV.

Los ratones C57BL/6 (blanco) o deficientes en TAP (negro) se inmunizaron i.p. con 5×10^5 mBMDC incubadas (blanco) o no (negra) con los péptidos A8R189 y A38L. Tras 14 días se infectan con 10^6 u.p.f de WR. Se determinó la respuesta secundaria frente a los péptidos en el bazo, 6 días tras la infección. Se representa el porcentaje de linfocitos T CD8 $^{+}$ que producen IFN γ frente a cada péptido. Datos de 2 ensayos independientes.

Este resultado indica que, a pesar de que los ratones deficientes en el transportador tengan quizás menor número de linfocitos T CD8 $^{+}$ y un repertorio distinto,

tras la vacunación generan una respuesta secundaria de linfocitos T CD8⁺ de memoria comparable a la que se observa en un ratón silvestre.

5.6.2. La vacunación con los péptidos que se presentan de forma independiente de TAP controló la infección posterior con VACV en ratones C57BL/6 o deficientes en TAP.

Para estudiar si la respuesta inmune de linfocitos T CD8⁺ inducida por la vacunación contribuía a una disminución de la carga viral, se analizó el título de virus en los ovarios de las hembras silvestres y deficientes en TAP vacunadas y se comparó con el de los controles no vacunados. A día 6, las hembras deficientes en TAP no vacunadas tenían una carga viral en el ovario alrededor de 10^7 u.f.p. mientras que en las hembras vacunadas el título viral se reducía aproximadamente unas 30 veces. En las hembras silvestres no vacunadas se observaban unos resultados similares y la reducción de la carga viral tras la vacunación era de 24 veces (Figura 37).

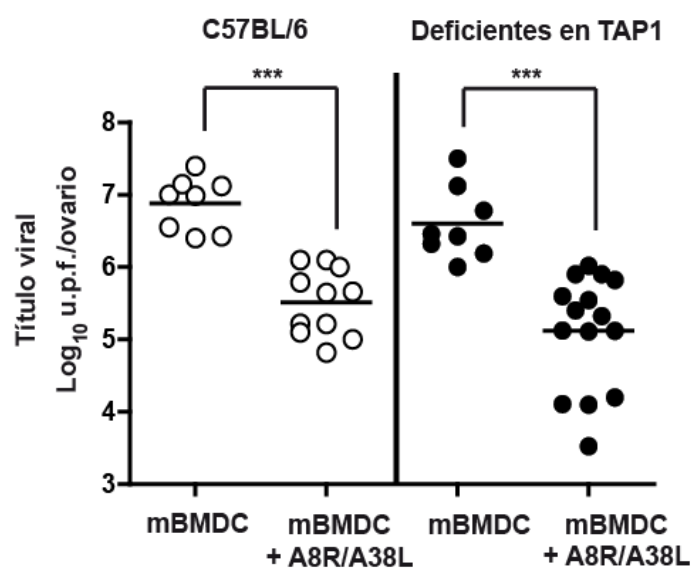


Figura 37. Reducción de la carga viral en el ovario tras la vacunación con los péptidos A8R189 y A38L.

Se analizó el título viral en los ovarios de las hembras C57BL/6 (izquierda) o deficientes en TAP (derecha) sin vacunar o tras la vacunación con A8R189 y A38L e infectadas como se indica en la Figura 36.

Estos datos demuestran que la vacunación con los epítomos que se presentan de forma independiente de TAP es suficiente para generar una respuesta protectora frente a la infección viral en el ratón deficiente en TAP, similar a la protección que se obtiene en un ratón silvestre, y confirma la relevancia fisiológica de la presentación independiente de TAP.

6. DISCUSIÓN

6.1. SISTEMA DE INHIBICIÓN DE TAP MEDIANTE ICP47.

Para evaluar la contribución de las vías de presentación de antígeno que no dependen de TAP en la respuesta antiviral, intentamos inhibir TAP con la proteína ICP47 de HSV-1 en cultivo celular mediante la utilización del péptido soluble ICP47 en células previamente permeabilizadas, siguiendo métodos descritos para ensayos de unión y transporte de péptidos a través de TAP (Lauvau y col. 1999; van Hall y col. 2007). Aunque permeabilizamos un alto porcentaje de las células con saponina, el sistema no nos funcionó, probablemente porque los ensayos de infección precisan que la célula mantenga totalmente su integridad estructural y funcional.

A continuación intentamos reproducir protocolos similares previamente publicados (Snyder y col. 1997), basados en coinfecciones o triples infecciones con distintos rVACV que expresan el antígeno, la molécula de MHC de clase I presentadora, e ICP47, pero no conseguimos detectar la acción de ICP47 sobre la presentación de antígenos dependiente de TAP. La ruta clásica desde el proteasoma hacia TAP funcionaba, ya que la presentación se inhibió por LC. Una hipótesis que podría explicar este resultado es que no consiguiésemos coinfectar todas las células, de forma que hubiese células que recibiesen sólo el virus expresando sólo el antígeno y que escapasen a la inhibición por ICP47.

Sólo cuando hicimos ensayos de presentación antigénica del epítipo B8R del propio VACV con células infectadas con WR o con rVACV-ICP47 pudimos ver el efecto rotundo de ICP47 sobre la presentación dependiente de TAP. Esto demuestra además que rVACV-ICP47 es funcional y mantiene la capacidad de bloquear TAP, incluso en un sistema de doble infección con un rVACV que exprese la molécula de MHC de clase I K^b. El resumen de las ventajas y desventajas de cada combinación de rVACV se muestra en la Tabla 17.

El hecho de que ICP47 bloquee la presentación de Ag dependientes de TAP sólo cuando estos se expresan por el mismo rVACV pone de manifiesto la necesidad de generar rVACV que expresen a la vez ICP47 y el antígeno de interés, lo cual resta

versatilidad al sistema. Sin embargo, en células humanas infectadas en paralelo con los virus WR y rVACV-ICP47 sí se podría estudiar la presentación independiente de TAP de antígenos propios de VACV, lo cual abre un nuevo campo de investigación.

rVACV	Sistema	Ventajas	Desventajas
ICP47 Ag MHC I	No inhibe	Gran versatilidad	
ICP47 Ag	No inhibe	Versatilidad media	Necesidad transfección estable con MHC I.
ICP47 + Ag	Inhibe		Necesidad transfección estable con MHC I. ICP47 y Ag en el mismo virus recombinante.
ICP47 + Ag MHC I	Inhibe	Permite estudiar varios haplotipos	ICP47 y Ag en el mismo virus recombinante.

Tabla 17. Sistemas de inhibición de TAP mediante rVACV-ICP47.

Se resumen los rVACV y las ventajas y desventajas de cada sistema.

6.2. ANÁLISIS GLOBAL DE LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS DE VACV POR VÍAS ALTERNATIVAS.

Hasta ahora ningún estudio había evaluado la contribución global de las vías de presentación de antígeno independientes de TAP en la respuesta inmune frente a un virus, objetivo de esta tesis. Así, elegimos a VACV, un poxvirus del cual se han descrito recientemente 49 epítomos que activan a linfocitos T CD8⁺ *in vivo* en la cepa de ratón C57BL/6 (Tschärke y col. 2005; Moutaftsi y col. 2006), de la que deriva el ratón deficiente en TAP.

Nosotros hemos demostrado que tras la infección con la cepa silvestre WR de VACV, los ratones deficientes en TAP generan linfocitos T CD8⁺ que reconocen antígenos propios de VACV. El reconocimiento con la misma eficiencia de BMDC deficientes o no en TAP e infectadas con el virus podría sugerir que los mismos epítomos independientes de TAP son procesados con una eficiencia comparable en presencia o ausencia de TAP. Los linfocitos T CD8⁺ de ratones C57BL/6 infectados con VACV también reconocen antígenos de VACV de forma independiente de TAP, aunque con marcada menor eficiencia que cuando se utilizan células con TAP.

Aunque la vía clásica que requiere de TAP es la vía de presentación de antígeno que genera mayor número de linfocitos T CD8⁺ en ratones que poseen TAP, parece que

las vías independientes de TAP contribuyen de forma significativa a la activación de linfocitos T CD8⁺ frente a VACV *in vivo*, pues una octava parte (13%) de los linfocitos T CD8⁺ del bazo de un ratón C57BL/6 infectado con VACV se activan *ex vivo* frente a antígenos cuya presentación no requiere de TAP.

De la misma manera analizamos *ex vivo* la contribución del proteasoma y de la proteasa citosólica TPPII al procesamiento global de antígenos de VACV en ratones silvestres. Nuestros datos indican que el proteasoma participa de forma importante en el procesamiento de antígenos de VACV, pero también son compatibles con una cierta presentación resistente al inhibidor usado, LC. No se pudo llegar a datos cuantitativos porque la LC no bloquea totalmente la actividad del proteasoma (Garcia-Medel y col. 2011), y porque los inhibidores del proteasoma bloquean la síntesis de proteínas de expresión post-replicativa, es decir intermedias y tardías (Satheshkumar y col. 2009; Teale y col. 2009). Sería muy interesante estudiar la contribución del proteasoma al procesamiento antigénico en ratones deficientes en TAP e infectados, pero por el momento no es posible técnicamente purificar adecuadamente sus pocos linfocitos T CD8⁺. Por otra parte, la presencia o ausencia de TPPII en las BMDC infectadas no tiene ningún efecto global sobre la presentación de los antígenos de VACV a linfocitos T CD8⁺, dato que apoya que el proteasoma sea la principal proteasa citosólica que procesaría los epítopos de VACV.

6.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EPÍTOPOS DE VACV QUE SE PRESENTAN POR VÍAS ALTERNATIVAS A LINFOCITOS T CD8⁺.

6.3.1. Identificación y caracterización del procesamiento antigénico alternativo de los epítopos de VACV.

6.3.1.1. Epítopos presentados por la vía clásica dependiente del proteasoma y de TAP.

Cuando analizamos la contribución individual de 30 epítopos descritos de VACV (Moutaftsi y col. 2006) a la respuesta de linfocitos T CD8⁺ frente a VACV, encontramos respuesta *ex vivo* de los ratones silvestres infectados frente a todos ellos. Nuestra jerarquía de inmunodominancia es algo distinta de la descrita por Moutaftsi y col. en el

bazo, aunque B8R se mantiene como el epítipo inmunodominante en la respuesta frente a VACV en el contexto H-2^b. Se han descrito diferencias en la jerarquía de inmunodominancia de los epítopos presentados por H-2^d tras distintas rutas de inmunización en ratones BALB/c (Oseroff y col. 2008). En nuestro caso utilizamos la misma vía de inmunización, por lo que nuestras diferencias pueden deberse a razones como la diferente calidad de los péptidos sintéticos, los distintos tejidos analizados u otras.

A partir de ratones silvestres, conseguimos generar *in vitro* líneas de CTL específicas frente a 27 péptidos sintéticos de VACV, que reconocían células TAP⁺ infectadas. Se probaron distintos agentes de inmunización previamente descritos (Badovinac y col. 2005) o distintos órganos de origen (Becker y col. 2005) para generar algunas líneas de CTL concretas pero estas son menos estables en cultivo o menos reproducibles que las anteriores. Por las dificultades técnicas encontradas con los antígenos más débiles de los estudiados, no parece técnicamente factible el análisis detallado de los 19 epítopos descritos restantes.

Se ha descrito que un mimotopo es un péptido sintético que es capaz de estimular *in vitro* a una línea de CTL activada por otro péptido *in vivo* (Belz y col. 2001; Yewdell 2005; Yuen y col. 2010). Estos mimotopos suelen ser péptidos que presentan una secuencia o conformación similar pero no idéntica a la del epítipo original. Nuestros 27 péptidos de VACV testados activan *ex vivo* e *in vitro* a CTL y además las líneas de CTL son activadas por BMDC TAP⁺ infectadas por VACV, lo que hace muy improbable que en algún caso se trate de mimotopos.

El papel del proteasoma se pudo analizar tan sólo en los epítopos de expresión temprana. Nueve de los doce epítopos tempranos y dependientes de TAP analizados siguen una vía clásica de presentación de antígeno dependiente del proteasoma. Siete de ellos derivan de proteínas citosólicas. B8R y B6R, que derivan de proteínas dirigidas al RE, podrían acceder al proteasoma bien durante su síntesis en forma de DRiPs citosólicos, o bien siguiendo la vía de degradación de proteínas del RE, o ERAD, tras su retrotranslocación post-traducciona al citosol.

En la Figura 38 se muestra un esquema de todos los epítopos analizados, clasificados según su vía de procesamiento.

6.3.1.2. Epítopos cuya presentación es dependiente de TAP pero resistente a inhibidores del proteasoma.

Una fracción de los linfocitos T CD8⁺ se activan por vías resistentes al tratamiento con LC en BMDC silvestres. Identificamos 3 epítopos tempranos derivados de proteínas citosólicas y dependientes de TAP (A51R, B2R y D1R578) que son resistentes a LC y que podrían explicar el anterior resultado. El procesamiento de estos epítopos requerirá por tanto de otras proteasas distintas del proteasoma, quizás de las descritas (Tabla 1). Su contribución se podría estudiar empleando BMDC de animales deficientes en algunas de ellas (Towne y col. 2005; Towne y col. 2007; Towne y col. 2008; Huai y col. 2008), como hemos hecho cuando hemos descartado la implicación de la TPPII en su procesamiento, o bien inhibidores químicos o siRNA específicos.

Por otra parte, el epítipo B2R podría ser destruido por la acción del proteasoma ya que se presenta mejor a CTL en presencia de LC, comportándose así como otros epítopos de MHC de clase I descritos con anterioridad tanto en humanos como en ratón derivados de proteínas por ejemplo del virus de la gripe (Vinitsky y col. 1997; Yellen-Shaw y col. 1997; Luckey y col. 1998) o de HIV (Anton y col. 1998; Sewell y col. 1999; Seifert y col. 2003) y también de proteínas tumorales (Valmori y col. 1999).

6.3.1.3. Epítopos presentados independientemente de TAP

Es llamativo que los linfocitos T CD8⁺ de ratones infectados y deficientes en TAP sean capaces de reactivarse por 12 epítopos distintos de los 30 ensayados. Así, la respuesta global independiente de TAP de linfocitos T CD8⁺ frente a VACV no se debe a la presentación de un único epítipo, sino al reconocimiento de varios epítopos subdominantes o de menor fortaleza que el epítipo B8R.

Es más, el hecho de que el conjunto de los 30 epítopos seleccionados de cuenta sólo del 90% de la respuesta frente a VACV sugiere que no necesariamente hemos identificado la totalidad de los epítopos independientes de TAP.

La jerarquía de inmunodominancia en los ratones deficientes en TAP es claramente diferente que la que aparece en ratones C57BL/6, siendo el epítipo J3R inmunodominante en estos ratones deficientes. Incluso, este epítipo J3R activa con

mayor eficiencia a los linfocitos T CD8⁺ de los ratones deficientes en TAP que a los silvestres. Sin embargo, esto no se explicaría por la falta de presentación del epítipo inmunodominante B8R en ausencia de TAP, ya que se ha descrito que la delección de este epítipo en MVA-ΔB8R no es compensada por una respuesta mayor de linfocitos T específicos frente a otros epítipos subdominantes (Kastenmuller y col. 2007; Gasteiger y col. 2007), hecho que hemos confirmado con WR-ΔB8R (datos no mostrados).

La inmunodominancia juega un papel importante en la capacidad para montar una respuesta inmune específica. Hay diferentes factores que interaccionan entre sí y que contribuyen a la inmunodominancia. Entre ellos se encuentran factores relacionados con la cantidad de antígeno como por ejemplo el sitio de infección, la abundancia de la proteína viral o la cinética de expresión de las proteínas virales. Son factores clave también la eficacia de procesamiento del antígeno, la afinidad del péptido por MHC de clase I y la cantidad y estabilidad de los complejos MHC/péptido. Entre los factores relacionados con las células T es importante el repertorio de linfocitos T o la frecuencia de precursores naïve CD8⁺ con el TCR apropiado para reconocer un péptido (Akram y Inman 2012). Sin embargo, un análisis somero de los ratones deficientes en TAP revela un repertorio de linfocitos T CD8⁺ funcionales similar al de ratones C57BL/6 (Sandberg y col. 1996), por lo que este factor quizás no contribuiría al cambio en la inmunodominancia. En ausencia de TAP la eficacia de procesamiento del antígeno por vías alternativas puede ser menor (Sigal y Rock 2000), lo cual unido a la menor cantidad de moléculas de MHC de clase I disponibles podría favorecer a distintos epítipos, comparando con los ratones silvestres. También podría ocurrir que se afectase diferencialmente la estabilidad de los complejos al unir péptidos con mayor hidrofobicidad que en C57BL/6, o con distinta afinidad, como lo sugiere la ligera ventaja de los epítipos con fenilalanina en posición 5 de anclaje a K^b. Por último, la posible distorsión de la vía secretoria en las células infectadas (ver discusión en apartado 6.3.3) podría favorecer la formación de complejos en distintos compartimentos, alterándose las posibilidades de unos epítipos frente a otros.

Ocho de las líneas de CTL obtenidas de ratones silvestres (J3R, L2R53, F5L, A38L, A8R189, A19L, A6L y F13L) fueron activadas tanto por BMDC TAP⁺ como TAP⁻ infectadas por el virus indicando que estos epítipos pueden procesarse y unirse a MHC de clase I en ausencia de TAP. No obstante, la vía mayoritaria de presentación de 6 de estos

epítomos es la vía dependiente de TAP. En esta línea, nuestro grupo ya había descrito previamente que la ruta secretoria independiente de TAP mediada por furina era minoritaria, aunque generaba aproximadamente un tercio de los complejos MHC/péptido que aparecen en la superficie de células TAP⁺ (Medina y col. 2009). Se ha descrito que un mismo epítipo puede presentar varias vías de procesamiento (Johnstone y col. 2008), lo que hemos observado en la mayor parte de los epítomos independientes de TAP.

La excepción la constituyen los epítomos F5L y F13L, que se presentan con la misma eficiencia en ambas células infectadas, sugiriendo que estos epítomos pueden tener una sola vía de presentación de antígeno, la independiente de TAP, como también se ha descrito previamente para otro antígeno viral (Johnstone y col. 2008).

Para 3 de los epítomos independientes de TAP (G8R, A25L, A23R), la cantidad de epítipo procesado en la BMDC TAP⁻ infectada parece estar por debajo del límite de sensibilidad de los CTLs, y técnicamente no ha sido posible la generación de CTL monoespecíficas a partir de los ratones deficientes en TAP, de forma que la evidencia de su presentación independiente de TAP se basa sólo en los ensayos *ex vivo*. Estos ensayos revelan muy claramente la respuesta independiente de TAP al epítipo G8R, mientras que la respuesta a los otros 2 es menos intensa. En cambio, podemos concluir firmemente que los otros 9 epítomos (J3R, L2R53, F5L, A38L, A8R189, A19L, A6L, F13L y E8R) se presentan independientemente de TAP a linfocitos T CD8⁺, ya que para la mayoría incluso se generan líneas de CTL de animales deficientes en TAP que reconocen a BMDC infectadas deficientes en TAP.

Resultados no mostrados indican que las APC TAP⁻ del bazo de animales infectados podrían mediar procesos de presentación cruzada o de infección secundaria, que no pudimos diferenciar, del tipo de los que nos llevaron a purificar los linfocitos T CD8⁺ para poder cuantificar correctamente la contribución de la presentación independiente de TAP en los animales silvestres (Figura 13). Nuestro diseño experimental ha estado dirigido al estudio de la presentación directa por las BMDC infectadas, ya que hemos infectado >99% de las células y hemos realizado todos los ensayos de presentación tras tan sólo 5-6 h de infección. Es por tanto improbable, aunque no se puede excluir del todo, que haya presentación cruzada de algún epítipo, es decir, que células infectadas fagocitasen a otras células infectadas y fuesen todavía funcionales para presentar

antígenos de forma cruzada y activar a linfocitos T CD8⁺. En cualquier caso, si este fuese el caso para los epítomos independientes de TAP, se trataría de presentación cruzada independiente de TAP, de la que sólo se han descrito algunos casos (Shen y col. 2004; Merzougui y col. 2011).

6.3.1.4. Epítomos cuya presentación es independiente de TAP pero mediada por el proteasoma.

De los 12 epítomos independientes de TAP, 5 son tempranos, por lo que se pudieron estudiar empleando LC. El procesamiento de todos ellos está mediado por el proteasoma. De ellos, 3 derivan de proteínas citosólicas: J3R, A8R189 y A23R. La presentación de A8R189 depende del proteasoma tanto en células TAP⁺ como TAP⁻. Para J3R, solo tenemos constancia en células TAP⁻. Para el epítomo A23R sólo lo hemos podido demostrar por razones técnicas en células TAP⁺, por lo que la evidencia de esta vía independiente de TAP pero mediada por el proteasoma es menos potente.

Los otros 2 epítomos tempranos, independientes de TAP y dependientes del proteasoma, L2R53 y F5L, derivan de proteínas de TM. Su procesamiento desde DRiPs o por ERAD podría explicar su acceso al procesamiento citosólico por el proteasoma. En particular el epítomo F5L parece seguir una única vía independiente de TAP y dependiente del proteasoma. Tras su procesamiento por el proteasoma, estos 5 epítomos podrían acceder de nuevo a compartimentos vesiculares por un mecanismo alternativo a TAP.

El estudio de la implicación del proteasoma en el procesamiento de epítomos individuales independientes de TAP (Tabla 2) prácticamente sólo se ha acometido en la bibliografía cuando estos epítomos derivan de proteínas de membrana, probablemente porque se tendía a pensar que estos epítomos seguían vías totalmente alternativas, es decir, simultáneamente independientes tanto de TAP como del proteasoma. El proteasoma participa en el procesamiento de sólo 2 de ellos, ambos derivados de la región TM de la proteína de membrana LMP2 de EBV (de la Salle y col. 1997; Lautscham y col. 2001; Lautscham y col. 2003b). El 88% restante de los epítomos publicados (Tabla 2) se procesa por otras proteasas desconocidas, o bien por proteasas del RE o vesiculares, como por ejemplo, la peptidasa señal, la peptidasa del péptido señal, la

furina o cathepsinas. Por ello, se tiende a pensar que los epítomos independientes de TAP en general no requieren del proteasoma para generarse, suponiendo que el acceso de las proteínas de membrana al RE les permite el acceso a otras proteasas. Sin embargo, en marcado contraste, todos los epítomos independientes de TAP derivados de proteínas de VACV que hemos podido analizar en este trabajo, y que incluyen a 3 citosólicas y a 2 de membrana, dependen del proteasoma (Tabla 18).

Tabla 18. Participación del proteasoma en el procesamiento de epítomos independientes de TAP de VACV.

Proteasoma	Epítomos	
	Número	%
Dependiente	5	100
Resistente a inhibidores	0	0
Desconocido	7	
Suma	12	

Se muestra el número de epítomos endógenos e independientes de TAP analizados en este trabajo que requieren del procesamiento por el proteasoma o que son resistentes a inhibidores del mismo. Se muestra el porcentaje relativo respecto de los que se conoce la participación del proteasoma. Para comparar con los resultados previamente publicados, véase Tabla 2.

En conclusión, sugerimos que en las descripciones individuales de epítomos independientes de TAP de la bibliografía existe un sesgo hacia proteínas dirigidas a la vía secretoria, con una preponderancia de vías resistentes a inhibidores del proteasoma. Por el contrario, cuando hemos analizado globalmente las vías naturales de procesamiento antigénico de epítomos independientes de TAP, el proteasoma adquiere un papel más destacado.

Todos los resultados obtenidos sobre la dependencia o no de TAP y del proteasoma demuestran que existe una alta prevalencia de rutas alternativas en la presentación de antígenos de VACV, que llevan a la generación de al menos la mitad de los epítomos estudiados (Figura 38). Los datos parciales empleando otros inhibidores de proteasas auxiliares, como las metalo-aminopeptidasas, confirman esta gran diversidad de rutas de procesamiento de antígenos virales.

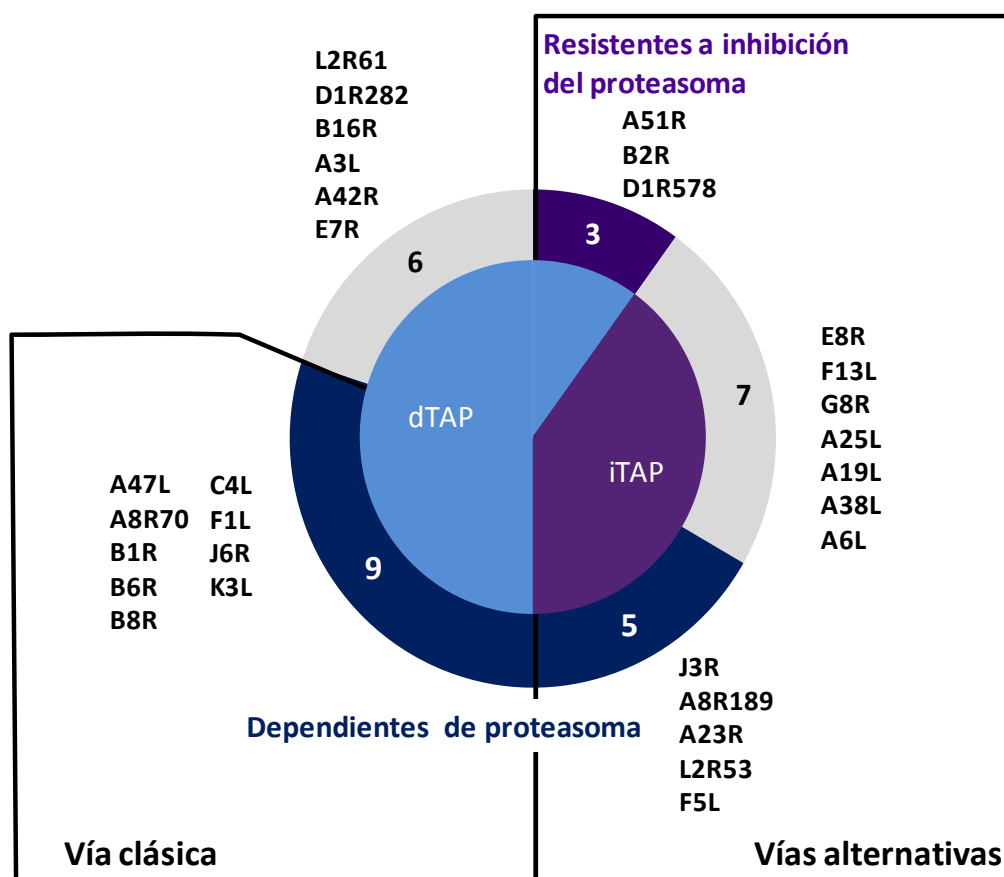


Figura 38. Prevalencia de rutas alternativas en la presentación de antígenos de VACV.

Se muestra el número de epítomos de VACV respecto a su dependencia de TAP (círculo interno) o del proteasoma (círculo externo). En gris claro se indican los epítomos cuya dependencia del proteasoma no se ha analizado. El rectángulo engloba todos los epítomos que siguen vías alternativas.

6.3.2. Análisis de las características de los epítomos de VACV que siguen vías alternativas de procesamiento y presentación antigénica.

Las características y vías de procesamiento de los ligandos de MHC de clase I descritos en la bibliografía han sido previamente revisadas por nuestro grupo (Johnstone y Del Val 2007; Del Val y col. 2011) y se resumen en la Tabla 4. Se basan en gran número de estudios de presentación de antígeno a CTL y en los últimos años en estudios de espectrometría de masas a gran escala de células no infectadas, que han permitido obtener una gran colección de epítomos independientes de TAP sobre los que analizar características que puedan explicar su procesamiento alternativo.

Un gran número de epítomos independientes de TAP, incluyendo los primeros descritos (Wei y Cresswell 1992; Henderson y col. 1992), son presentados por HLA-A2, un alotipo que preferiblemente selecciona péptidos hidrofóbicos. Por ello, los ligandos de HLA-A2 frecuentemente derivan de la secuencia señal de proteínas de membrana. Sin embargo, esta preferencia tan marcada no se extiende a otros alotipos (Del Val y col. 2011). Nuestro trabajo no contribuye a este punto, ya que ninguno de los 49 epítomos descritos previamente en VACV (Moutaftsi y col. 2006) deriva de secuencias señal.

En general los epítomos independientes de TAP descritos en la bibliografía se adaptan menos a los motivos de unión a MHC de clase I y tienen una afinidad de unión baja ya que algunos son ligeramente más largos. Nuestro trabajo no aporta datos nuevos sobre este tema, ya que los epítomos de VACV se han predicho utilizando algoritmos basados en los motivos de unión y en la afinidad a MHC. Además son epítomos de 8, 9 y 10 aa, por lo que no hemos analizado péptidos extendidos. Sin embargo, sí se observó cierto uso diferencial del residuo del extremo carboxilo del péptido de anclaje a K^b entre los epítomos dependientes y los independientes de TAP (

Tabla 15), así como cierta tendencia a mayor inmunodominancia entre los epítomos independientes de TAP según el residuo en la posición 5 de anclaje a K^b (Figura 35). Estas observaciones podrían sugerir que los péptidos independientes de TAP accedan quizás a una población distinta de moléculas de MHC de clase I, bien por su localización celular distinta del RE o bien por el conjunto de péptidos al que están expuestas.

Los epítomos independientes de TAP que derivan de proteínas citosólicas, así como aquellos que aún siendo independientes de TAP requieren del proteasoma citosólico, requieren de un mecanismo para acceder a los compartimentos vesiculares y unirse a las moléculas de MHC de clase I. Se ha descrito una buena correlación entre la hidrofobicidad de los epítomos y la independencia de TAP (Lautscham y col. 2001; Lautscham y col. 2003a), sugiriendo que los péptidos pueden tener la habilidad de atravesar las membranas por difusión pasiva, a pesar de que se requieren grandes cantidades de péptido para que difunda al RE (Ratnikov y col. 2002). Nosotros también hemos observado que los epítomos independientes de TAP de VACV, incluso los derivados de proteínas citosólicas, son más hidrofóbicos que los dependientes de TAP. Lautscham y col. ya demostraron que la independencia de TAP de un epítomo TM de EBV

con alta hidrofobicidad se mantenía cuando se cambiaba su localización a una proteína nuclear. Así la hidrofobicidad y no la localización celular explicaría quizás por qué estos péptidos tienen un procesamiento alternativo.

Otros mecanismos posibles que podrían explicar su transporte alternativo a TAP serían Sec61, si funcionase en dirección anterógrada, además de la descrita en retrotranslocación de péptidos al citosol (Koopmann y col. 2000), u otros transportadores no definidos. La autofagia se ha propuesto recientemente como un potencial mecanismo para que péptidos citosólicos accedan a compartimentos vesiculares donde hay moléculas de MHC de clase I recicladas desde la membrana (Crotzer y Blum 2009; English y col. 2009; Münz 2010; Chemali y col. 2011).

6.3.3. Análisis de las características de las proteínas de VACV de las que derivan los epítomos.

Con el fin de encontrar alguna propiedad que pudiese explicar el procesamiento alternativo de los epítomos de VACV hemos analizado varias características de las proteínas de origen, como por ejemplo: la expresión temporal, su papel en el ciclo de replicación viral, su localización subcelular y su localización durante la morfogénesis viral. El subconjunto de epítomos analizados es una muestra representativa de los epítomos de VACV totales descritos en el contexto de H-2^b y de las proteínas totales de VACV. Sin embargo, sí hemos detectado diferencias entre los epítomos que se procesan de forma dependiente o independiente de TAP. Mientras que los epítomos dependientes de TAP derivan en su mayoría de proteínas citosólicas, de expresión temprana y con funciones de regulación viral e interacción con el huésped, existe una clara tendencia a que los epítomos independientes de TAP deriven de proteínas de membrana, de expresión post-replicativa, localizadas en factorías virales y asociadas al virión (Figura 28).

Esta observación podría indicar que la reorganización de membranas derivadas del RE que tiene lugar en la formación de las factorías virales y en la morfogénesis de los viriones progenie en la fase post-replicativa de la infección (Husain y col. 2006; Husain y col. 2007) podría favorecer el procesamiento independiente de TAP de las proteínas y/o el acceso de los epítomos a moléculas de MHC de clase I en localizaciones no canónicas.

También es posible que una posible baja eficacia del procesamiento independiente de TAP (Sigal y Rock 2000) se beneficie del generalmente elevado nivel de síntesis de las proteínas que se expresan en la fase posterior a la replicación del DNA viral.

Se ha publicado que proteínas modelo que se expresen de forma tardía por VACV no serían presentados de forma directa en DC infectadas, al ser muy limitada su expresión (Tewalt y col. 2009). Sin embargo, otros autores detectan expresión viral tardía tanto en DC maduras (Yates y Alexander-Miller 2007) como en la línea dendrítica DC2.4 (Moutaftsi y col. 2009). Además, se ha detectado tanto expresión proteica como presentación antigénica intermedia en células DC2.4 (D. Tschärke, comunicación personal). Los únicos 3 epítomos tardíos descritos se encuentran entre los menos inmunodominantes de los 49 descritos (Moutaftsi y col. 2006). Sólo por ello, no se encuentran entre los seleccionados para nuestro estudio, que sólo incluye a proteínas de expresión temprana e intermedia, todas las cuales se presentan por MHC de clase I en DC infectadas, de acuerdo con el segundo grupo de autores.

También se ha sugerido con antígenos modelo por el mismo grupo de Norbury que los epítomos derivados de proteínas tardías “secuestradas” en factorías virales no podrían siquiera acceder a rutas de presentación cruzada por DC. Si accederían, en cambio, los derivados de proteínas de membrana o que forman parte de viriones maduros que salen de las factorías (Tewalt y col. 2009). Nosotros hemos estudiado 11 epítomos que derivan de proteínas de transcripción intermedia, que como las tardías se expresan tras la replicación del DNA viral. De ellas, todas escaparían de este secuestro, salvo quizás la proteína A19, con un epítomo independiente de TAP, proteína para la que los datos son insuficientes en la literatura. La potencial discrepancia con la propuesta de Norbury podría explicarse por una potencial diferencia entre proteínas intermedias y tardías en cuanto a presentación antigénica, pero es poco probable, ya que la diferencia entre ellas no es tanto temporal ni de localización subcelular, sino más bien debida a los factores de transcripción implicados en la expresión de los respectivos genes. Quizá se explique mejor porque su hipótesis se ha generalizado a partir de datos obtenidos con una proteína modelo (Tewalt y col. 2009). Sería interesante en cualquier caso determinar si *in vivo* hay contribución de células infectadas que no sean APC profesionales (Thomas y col. 2007) a la inducción de linfocitos T CD8⁺ frente a los pocos epítomos derivados de proteínas secuestradas en factorías virales.

En la fase post-replicativa de la infección por VACV, se inicia la formación de las factorías vírales reclutando gran cantidad de membranas, parte de las cuales proceden del RE. En estas factorías tiene lugar la síntesis de la práctica totalidad de las proteínas de la célula, que ya son casi exclusivamente proteínas virales. Las proteínas virales de membrana sintetizadas en esta fase no se glicosilan y van directamente del RE a las factorías. De hecho, las pocas proteínas glicosiladas de VACV, que migran del RE al TGN o a la membrana plasmática, son de expresión temprana. En estas condiciones post-replicativas, sería de esperar que el complejo de carga de MHC de clase I se nutra principalmente de péptidos derivados de proteínas virales, aunque dadas las potenciales baja síntesis *de novo* de MHC de clase I y desconexión con la vía secretoria constitutiva es posible que la presentación de antígeno convencional no sea plenamente funcional. Sería interesante determinar si los antígenos presentados en esta fase, especialmente pero no sólo los independientes de TAP, acceden a compartimentos subcelulares diferentes donde unirse a moléculas de MHC de clase I quizá de reciclaje, o si acceden a rutas alternativas como la presentación cruzada o la autofagia (Tewalt y col. 2009; Tey y Khanna 2012).

Nueve de las proteínas de VACV se han denominado inmunoprevalentes, por dar lugar a varios epítomos presentados por diversos alotipos de MHC de clase I (Oseroff y col. 2008). De ellas hemos analizado 5, que contienen 6 epítomos, y sólo 1 (A25L) es independiente de TAP en el contexto de H-2^b. Es frecuente que una misma proteína contenga varios epítomos y que unos requieran de TAP mientras que otros se presentan de forma independiente de TAP (Hammond y col. 1993; Hammond y col. 1995; Lautscham y col. 2001), como ocurre con nuestras proteínas L2 y A8.

Existe un buen número de estudios en los que se analiza individualmente la presentación a CTL específicos de epítomos derivados de proteínas virales o tumorales que se presentan de forma independiente de TAP. La mayoría (72%) de estos epítomos endógenos e independientes de TAP de los que se conoce su localización en la proteína derivan del procesamiento de proteínas de membrana (Tabla 19). Aunque hay una proporción semejante de proteínas diseñadas de localización citosólica o de membrana, entre estas últimas todas las diseñadas están dirigidas intencionadamente al RE mediante la adición de una secuencia señal que no contiene al epítomo, de forma que la mayoría de los epítomos son luminales. Si no tenemos en cuenta este sesgo, los epítomos

derivados de estas proteínas de membrana están localizados más o menos con igual frecuencia en regiones luminales, en la secuencia señal (la mayoría presentados por HLA-A2), y en regiones TM (todos ellos de una sola proteína viral, la LMP2 de EBV).

Individuales		Localización del epítipo			
Proteína	%		Número	%	
Citoplasmática	28%	Citosol	10	28%	4 diseñadas
Membrana	72%	Lumen	15	42%	8 diseñadas
		Secuencia señal	5	14%	3 de HLA-A2
		TM	6	17%	6 de LMP2 de EBV
		Suma	36	100%	

Tabla 19. Análisis publicados de epítipos individuales independientes de TAP: localización de los epítipos en la proteína de origen.

Se muestra el número y porcentaje de epítipos endógenos e independientes de TAP descritos en la literatura, clasificados según su localización en la proteína de origen. En 3 casos, de trata de construcciones no naturales con epítipos luminales y dotadas de una secuencia señal que las dirige al RE. Basada en las mismas referencias que la Tabla 2.

En los estudios a gran escala de espectrometría de masas de ligandos independientes de TAP derivados de proteínas de membrana en células no infectadas (Figura 3 y Tabla 20) se detectan un 30% de epítipos derivados de la zona luminal, y un 65% de ligandos derivados de secuencias señal, aunque la inmensa mayoría son presentados por HLA-A2, debido a la amplia utilización de líneas celulares con este alotipo, que acomoda bien una alanina en la posición carboxilo terminal del péptido, residuo que la peptidasa señal frecuentemente genera en el carboxilo terminal. Sin embargo, curiosamente, tan solo 3 ligandos provienen de regiones TM. Nuestros datos tan sólo identifican 1 epítipo luminal, y no aportan información sobre la secuencia señal, pues ninguno de los epítipos descritos está localizado en esta región de las proteínas. Sin embargo, nuestros datos apoyan fuertemente los datos obtenidos con la proteína viral LMP2 respecto a la localización en la región TM de sus 6 epítipos independientes de TAP. Excepto en 1 caso, todas nuestras proteínas con regiones TM contienen un epítipo independiente de TAP localizado en alguna región TM de la proteína. Sería interesante averiguar si esta tendencia a la presentación tan frecuente de regiones TM por vías independientes de TAP es una característica asociada a las infecciones virales. Para ello, sería necesario un análisis semejante al de esta Tesis con

otro virus grande y con muchos epítomos definidos, como por ejemplo CMV murino (Munks y col. 2006).

Gran escala		Localización del epítomo			
Proteína	%		Número	%	
Citoplasmática	72%	Citosol	126	72%	
Membrana	28%	Lumen	15	9%	
		Secuencia señal	31	18%	24 de HLA-A2
		TM	3	2%	
		Suma	175	100%	

Tabla 20. Análisis publicados de ligandos independientes de TAP en células no infectadas, identificados por espectrometría de masas a gran escala: localización de los ligandos en la proteína de origen.

Se muestra el número y porcentaje de epítomos endógenos e independientes de TAP descritos en la literatura, clasificados según su localización en la proteína de origen. Datos de (Wei y Cresswell 1992; Luckey y col. 1998; Lorente y col. 2011) junto con los compilados en (Del Val y col. 2011).

Recientemente se ha descrito que las regiones TM, cuando se deslocalizan de su sitio natural en la membrana durante el proceso de ERAD y son enviadas al citosol, sirven como motivo de degradación preferente para el procesamiento por el proteasoma, favoreciendo así el aporte de péptidos a MHC de clase I (Huang y col. 2011). Durante una infección la célula, que esta sintetizando de forma masiva proteínas virales, está sometida a un estrés de plegamiento y a una reducción de la cantidad de chaperonas disponibles pudiéndose quizás generar una gran cantidad de regiones TM deslocalizadas. Por medio de ERAD, las regiones TM deslocalizadas de las proteínas F5 y L2 podrían ser una señal de degradación que las enviase al proteasoma, aunque no se explicaría su independencia de TAP. En este contexto, sería interesante estudiar si el proteasoma está también implicado en el procesamiento de los otros 4 epítomos derivados de regiones TM e independientes de TAP, que no se ha podido hacer por derivar de proteínas de expresión post-replicativa.

Finalmente, ninguna de las 2 proteínas de membrana secretadas analizadas contiene un epítomo independiente de TAP, pero su bajo número no permite reflexionar sobre su significancia.

Por otra parte, en la bibliografía se encuentran pocos ejemplos de epítomos citosólicos y nucleares que se presenten a CTL de forma independiente de TAP (Tabla 19). Por el contrario, los estudios a gran escala de espectrometría de masas de células no infectadas revelan sorprendentemente que la mayoría de los ligandos de MHC de clase I independientes de TAP, el 72%, derivan de proteínas citosólicas (Figura 3) (revisado en (Del Val y col. 2011)). Nuestros resultados muestran que la mitad de los epítomos de VACV independientes de TAP derivan de proteínas de membrana y la otra mitad de proteínas citoplásmicas. Igual que los estudios a gran escala de células no infectadas (Suri y col. 2006; Weinzierl y col. 2008; Oliveira y col. 2009), nuestros análisis han sido realizados de manera no sesgada, sin ideas previas sobre qué proteínas podrían ser procesadas de manera independiente de TAP. Quizá por ello, la distribución membrana/citosol de nuestros epítomos independientes de TAP se acerca más a la de estos estudios a gran escala, y cuestiona la idea preconcebida de que si la proteína sorteó TAP y entra a la vía secretoria hay más probabilidades de que lo haga el epítomo y su presentación sea independiente de TAP. Es un hecho notable que nuestros datos confirman que las vías de producción de ligandos para MHC de clase I independientes de TAP también muestrean ampliamente las proteínas que se encuentran en el citosol de la célula infectada, y no sólo en compartimentos vesiculares, contrariamente a lo comúnmente asumido.

En la Figura 39 proponemos distintas vías de procesamiento y de transporte alternativos a TAP que podrían utilizar los epítomos de VACV para acceder a los compartimentos donde pueden unirse a moléculas de MHC de clase I.

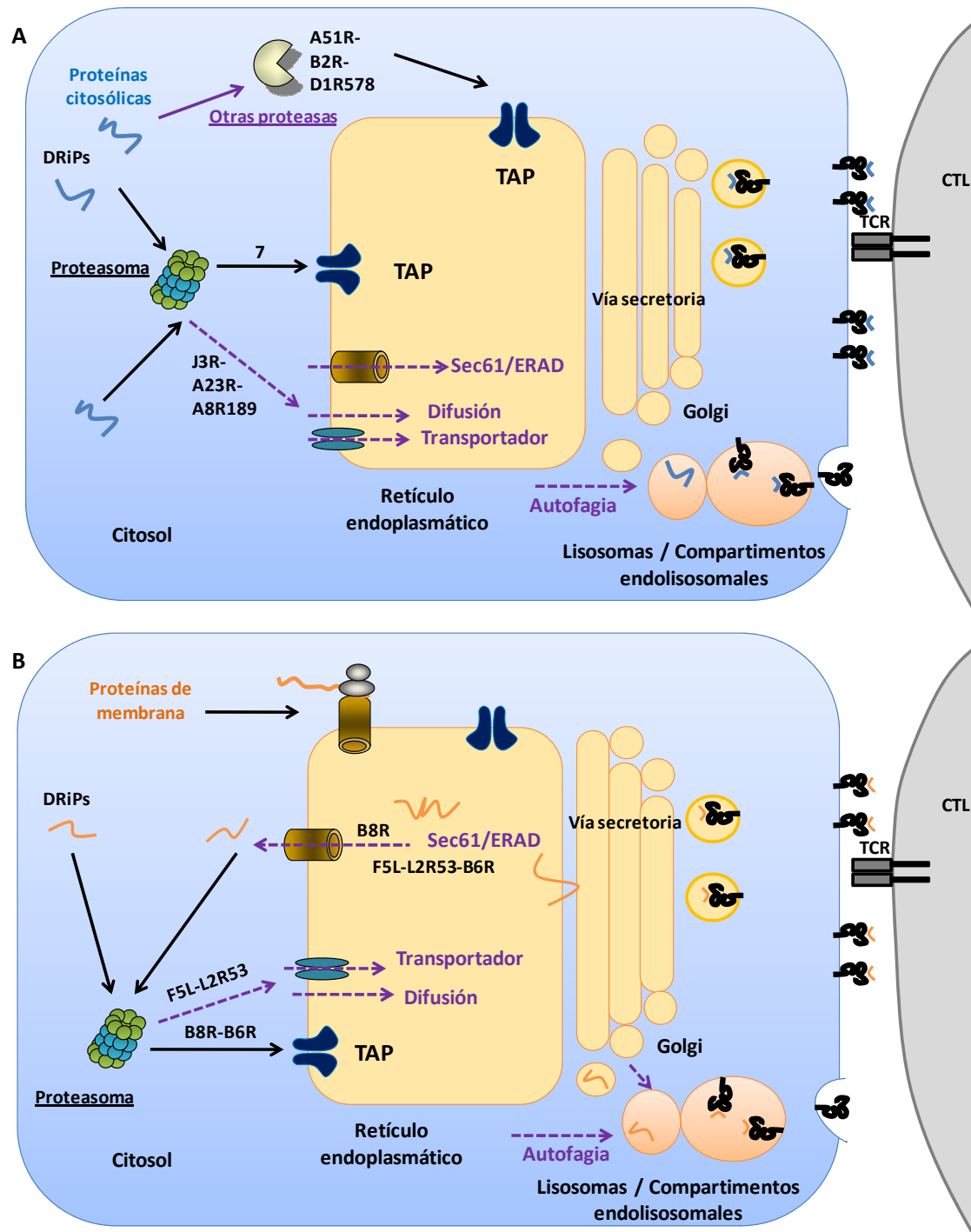


Figura 39. VACV utiliza diferentes rutas en el procesamiento de sus antígenos.

A) Las **proteínas citosólicas** (color azul) o sus DRiPs pueden ser procesados por el proteasoma (7 péptidos) o de forma alternativa por otras proteasas citosólicas (A51R, B2R y D1R578) y ser transportados al RE a través de TAP. En células deficientes en TAP, varios mecanismos hipotéticos (flechas moradas discontinuas) permitirían que las proteínas y péptidos citosólicos como J3R, A23R y A8R189 accedan tras su procesamiento por el proteasoma a compartimentos vesiculares y secretorios: difusión pasiva a través de membrana, transporte a través de Sec61 u otro transportador desconocido o bien mecanismos de autofagia a través de transportadores endolisosomales. B) Las **proteínas de membrana** (color naranja) acceden al RE de forma cotraduccional y pueden seguir la vía secretoria. Hay ejemplos como la proteína con secuencia

señal B8 que sigue la vía clásica proteasoma-TAP, por lo que su epítipo, o bien se origina en el citosol a partir de DRIPs en el inicio de su traducción o a partir de proteínas maduras que deben ser retrotranslocadas al citosol. Este mismo mecanismo de acceso al proteasoma podría ser utilizado para el procesamiento de las proteínas con regiones TM, F5, L2 y B6; sin embargo, tras su procesamiento citosólico los 2 primeros epítipos requieren de un transporte alternativo a TAP (flechas moradas) para acceder a las moléculas de MHC de clase I. Las proteínas localizadas en la vía secretoria también podrían acceder a moléculas de MHC de clase I de reciclaje en los compartimentos endolisosomales.

6.4. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA PRESENTACIÓN INDEPENDIENTE DE TAP.

VACV fue el agente vacunal utilizado frente a la viruela humana. Sin embargo, no se conoce a fondo cuál es el mecanismo de acción de esta vacuna con la que se consiguió finalmente erradicar la enfermedad en el año 1977. Existe un gran interés en el estudio y empleo de VACV como vector vacunal para el desarrollo de vacunas contra patógenos y tumores. Actualmente se han propuesto diferentes líneas atenuadas de VACV como MVA (Sutter y col. 1994), Copenhagen (Tartaglia y col. 1992), NYVAC o mutantes de delección seleccionados (García-Arriaza y col. 2011). Recientemente se ha descrito que la proteína CPXV12 de una única cepa del virus *cowpox* bloquea TAP e inhibe la translocación de péptidos al lumen del RE (Byun y col. 2009; Alzhanova y col. 2009). Dado que en las primeras inmunizaciones frente a la viruela se supone que se utilizaba *cowpox* como agente vacunal, sería posible que los epítipos independientes de TAP pudiesen haber contribuido notablemente a la inmunización y protección frente a la viruela.

Los pacientes deficientes en TAP tienen reducida la expresión de moléculas de HLA de clase I en superficie y sufren de infecciones bacterianas recurrentes sobre todo del tracto respiratorio superior y de lesiones en la piel (granulomatosis necrotizante). Sin embargo, no son especialmente susceptibles a infecciones virales o por otros patógenos y tienen niveles de anticuerpos normales frente a varios virus (Gadola y col. 2000). Respecto a su repertorio de linfocitos en sangre, presentan una expansión de células NK y linfocitos T $\gamma\delta$ pero un número bajo de linfocitos T CD8⁺ $\alpha\beta$ (de la Salle y col. 1994). No obstante, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos son capaces de reconocer antígenos virales y desencadenar una respuesta específica frente a ellos (de la Salle y col. 1997). Por tanto, las vías de presentación de antígeno independientes de TAP posiblemente son relevantes en el control de muchas infecciones y son por ello la base de nuestro estudio.

Previamente se han descrito casos de protección frente a patógenos como VACV (Snyder y col. 2004) o *Listeria monocytogenes* (Rolph y Kaufmann 2000) o frente a tumores deficientes en TAP (van Hall y col. 2007) mediante la vacunación con epítomos independientes de TAP. Nosotros hemos mostrado que la vacunación con DC incubadas con péptidos que se presentan de forma independiente de TAP protege a ratones silvestres y deficientes en TAP de una manera similar, disminuyendo significativamente la carga viral en el ovario de hembras infectadas. Esto indica que las vías independientes de TAP también son operativas en células normales del organismo, como las del ovario, y no sólo en células presentadoras de antígeno profesionales, como las DC

Concluimos que los epítomos que se presentan por vía alternativas a la vía clásica contribuyen a la respuesta protectora de linfocitos T CD8⁺ frente a la infección con virus como VACV. Es importante seguir caracterizando las propiedades de estos epítomos e identificando las rutas alternativas que participan en su procesamiento para el diseño de nuevas vacunas recombinantes basadas en epítomos.

7. CONCLUSIONES

1. De los linfocitos T CD8⁺ antivirales que se activan en la respuesta primaria en ratones infectados por VACV:
 - el 13% reconoce antígenos que se presentan de forma independiente de TAP por MHC de clase I,
 - la mayoría reconoce antígenos procesados por el proteasoma,
 - no se detecta la contribución de antígenos procesados por TPPII.
2. Se identifican 12 epítomos de VACV que se presentan independientemente de TAP *in vivo*, 9 de los cuales se confirman en células dendríticas infectadas en cultivo, empleando líneas de CTL monoespecíficas de cada epítomo.
3. Los 12 epítomos virales independientes de TAP son más hidrofóbicos que los 18 que dependen de TAP y con mayor frecuencia derivan de proteínas de expresión post-replicativa en el ciclo viral, asociadas al virión, de membrana y localizadas en factorías virales.
4. Los 6 epítomos independientes de TAP que derivan de proteínas virales de membrana están localizados parcial o totalmente en la región TM de la proteína excepto en un único caso. Los otros 6 epítomos independientes de TAP se localizan en proteínas virales citosólicas, contrariamente a lo comúnmente asumido en el campo.
5. De los 24 epítomos virales analizados en detalle, sorprendentemente la mayoría (15) siguen vías de procesamiento y presentación antigénica distintas de la vía clásica, pues o no requieren TAP (12) o son resistentes a la inhibición del proteasoma (3).
6. En contra de lo que se ha descrito mayoritariamente en la bibliografía, los 5 epítomos independientes de TAP de VACV que hemos podido analizar se procesan por el proteasoma, incluso aquellos derivados de proteínas de membrana, por lo que requieren de algún mecanismo posterior de transporte a compartimentos vesiculares para su acceso a MHC de clase I.
7. Los linfocitos T CD8⁺ de memoria activados por la vacunación con 2 epítomos independientes de TAP son igualmente eficientes en el control de la infección por VACV en ratones C57BL/6 que en ratones deficientes en TAP.

VIRUS VACCINIA (VACV)		
Nombre	Características	Referencia
WR	Cepa silvestre Western reserve	
vΔB8R	Mutante de delección que no expresa la proteína B8R	(Verardi y col. 2001)

VIRUS VACCINIA RECOMBINANTES, rVACV						
Nombre	Proteína foránea	Epítipo	Cepa VACV de origen	Promotor ^a	Características	Referencia
rVACV-ICP47	ICP47 de HSV-1	-----	WR	7,5 K	tk ⁻	(Snyder y col. 1997)
VV-F [#]	F de RSV	F85-93	WR (vRB12)	7,5K Sintético	tk ⁺	(Bembridge y col. 1998)
VV-Fsig ⁻ [#]	Fsig ⁻ de RSV	F85-93	WR (vRB12)	7,5 K Sintético	tk ⁺	(Bembridge y col. 1998)
rVACV-K ^d	K ^d	-----	WR	7,5 K	tk ⁻	(Bacik y col. 1994)
rVACV-K ^b	K ^b	-----	WR	7,5 K	tk ⁻	(Bacik y col. 1994)
VV-GFP-Jaw1-Ova [*]	GFP-Jaw1-Ova	SIINFEKL	WR	7,5 K Sintético	tk ⁻	(Prlic y col. 2005)
cC-Ova [*]	cC-Ova	SIINFEKL	Copenhagen	7,5 K Sintético	tk ⁻	(Medina y col. 2009)
sC-OvaΔC [*]	sC-OvaΔC	SIINFEKL	Copenhagen	7,5 K Sintético	tk ⁻	(Medina y col. 2009)

Tabla 21. Virus utilizados.

^a El promotor 7,5K sintético es un promotor temprano/tardío optimizado a partir del promotor 7,5 K natural. [#] El epítipo F85-93 se presenta por K^d por la vía clásica dependiente del proteasoma y de TAP a partir del virus VV-F. Por el contrario, F85-93 se presenta independientemente del proteasoma e independientemente de TAP a partir del virus VV-Fsig⁻. ^{*} El epítipo SIINFEKL se presenta por la vía clásica dependiente del proteasoma y de TAP a partir de los virus GFP-Jaw1-Ova y cC-Ova. Por el contrario, SIINFEKL se presenta independientemente del proteasoma e independientemente de TAP a partir del virus sC-OvaΔC.

Proteína	Longitud (aa)	Expresión temporal ^a	Localización subcelular ^b		Secuencia señal	Dominios TM	Categoría funcional ^a	Función
A19	78	Intermedio	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Desconocido	Proteína hipotética 8,3 kD
A23	383	Temprano	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Transcripción	Subunidad de 45 kD del factor de transcripción viral intermedio 3 (VITF-3)
A25	725	Intermedio	Membrana	Factoría viral	-	1	Asociación al virión	Proteína asociada a la membrana del MV. Proteína de inclusión tipo A truncada
A3	643	Intermedio	Citoplasma	Factoría viral y core	-	-	Asociación al virión	Precursor p4b de la proteína 4b del core
A38	278	Intermedio	Membrana	Membrana celular y microsomas	Si	5	Asociación al virión	Glicoproteína de 32 kD similar a proteínas asociadas a integrinas. Promueve el flujo de calcio extracelular en células infectadas
A42	134	Intermedio	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Asociación al virión	Homólogo de profilina
A47	253	Temprano	Citoplasma		-	-	Desconocido	Desconocida
A51	335	Temprano	Citoplasma		-	-	Desconocido	Proteína hipotética de 31,7 kD no esencial
A6	372	Intermedio	Citoplasma	Factoría viral y core	-	-	Asociación al virión	Proteína del core del virión esencial para la morfogénesis
A8 ^d	289	Temprano	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Transcripción	Subunidad de 32 kD del factor de transcripción viral intermedio 3 (VITF-3)
B1	301	Temprano	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Replicación del ADN	Ser/Thr quinasa
B16	327	Intermedio	Lumen, secretada		Si	-	Interacción con el huésped	Receptor soluble de IL-1 β
B2	220	Temprano	Citoplasma		-	-	Desconocido	Desconocida
B6	173	Temprano	Membrana		-	1	Desconocido	Proteína tipo anquirina
B8	273	Temprano	Lumen, secretada		Si	-	Interacción con el huésped	Receptor soluble de IFN γ
C4	316	Temprano	Citoplasma		-	-	Interacción con el huésped	Antagonista del receptor de IL-1

D1 ^d	845	Temprano	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Transcripción	Subunidad grande de la enzima de "capping" del ARNm. Factor de terminación de la transcripción VTF
E7	167	Intermedio	Citoplasma (asociada a membrana)	EEV	-	-	Desconocido	Proteína miristoilada del EEV
E8	274	Intermedio	Membrana RE	Factoría viral y core	-	2	Asociación al virión	Proteína de membrana asociada con el core y con IV e IMV
F1	227	Temprano	Citoplasma Mitocondria	Mitocondria	-	-	Interacción con el huésped	Inhibe la apoptosis interfiriendo la liberación del citocromo C
F13	373	Intermedio	Citoplasma (asociada a membrana TGN)	EEV	-	-	Asociación al virión	Proteína palmitoilada vp37 de la membrana del EEV
F5	323	Temprano	Membrana		Si	1	Desconocido	Desconocida
G8	261	Intermedio	Membrana	Factoría viral	-	1	Transcripción	Factor de transcripción de los genes tardíos VLTF-1
J3	334	Temprano	Citoplasma	Factoría viral y core	-	-	Transcripción	Multifuncional: subunidad de la poliA-polimerasa, cap-metiltransferasa y factor de elongación de la transcripción
J6	1288	Temprano	Citoplasma	Factoría viral	-	-	Transcripción	Subunidad rpo147 de la polimerasa de ARN dependiente de ADN
K3	89	Temprano	Citoplasma		-	-	Interacción con el huésped	Resistencia a interferón, inhibidor de PKR similar a eIF2 α .
L2 ^d	87	Temprano	Membrana	Factoría viral	-	2	Desconocida	Formación y elongación de la membrana creciente y de viriones inmaduros ^c

Tabla 22. Resumen de las características de las proteínas de VACV.

Información obtenida de *Poxvirus Bioinformatics Resource* y *UniProt Knowledgebase*.^a (Yang y col. 2010),^b (Chung y col. 2006; Resch y col. 2007)^c (Maruri-Avidal y col. 2011).^d Proteínas con 2 epítomos analizados en este trabajo. Las proteínas resaltadas en gris contienen un epítomo independiente de TAP. Las categorías funcionales "transcripción" y "replicación del ADN" se engloban en la categoría "regulación viral" en la Figura 28.

Epítipo	ICS <i>ex vivo</i> % IFN γ ⁺ CD8 ⁺ /CD8 ⁺ ^a		Orden de inmunodominancia		Hidrofobicidad ^b	Tamaño (aa)	MHC (H-2)	Secuencia ^c	Posición del epítipo en la proteína ^d
	WT	Deficiente en TAP1	WT	Deficiente en TAP1					
J3R (289-296)	2,3	4,4	19	1	5,50	8	K ^b	SIFRFLNI	Citoplasma
G8R (34-41)	10,0	3,0	2	2	7,50	8	K ^b	LMYIFAAL	5 aa TM + 3 aa citoplasma
F5L (279-287)	2,2	2,5	20	3	-0,44	9	D ^b	SAPMNVNVL	1 aa TM + 8 aa luminal
L2R (53-61)	4,0	2,5	12	4	8,26	9	K ^b	VIYIFTVRL	9 aa TM
A38L (203-210)	1,6	1,7	27	5	6,47	8	K ^b	KVFSFWLL	6 aa TM + 2 aa citoplasma
A8R (189-196)	5,2	1,6	7	6	8,11	8	K ^b	ITYRFYLI	Citoplasma
A19L (47-55)	2,4	1,5	18	7	4,01	9	K ^b	VSLDYINTM	Citoplasma
A6L (265-272)	4,1	1,1	11	8	5,25	8	K ^b	YTLIYRQL	Citoplasma
A25L (257-264)	2,1	0,9	21	9	4,67	8	K ^b	SIYQYVRL	Luminal
A23R (297-305)	2,7	0,6	17	10	6,71	9	D ^b	IGMFNLTFI	Citoplasma
F13L (307-315)	1,7	0,6	25	11	0,41	9	D ^b	FTIQNNTKL	Citoplasma
E8R (141-150)	1,4	0,5	28	12	4,42	10	D ^b	FWFKNTQFDI	3 aa TM + 7 aa citoplasma
L2R (61-69)	3,2	0,3	14		3,07	9	K ^b	LVSRNYQML	3 aa TM + 6 aa luminal
B16R (275-283)	1,7	0,2	24		3,56	9	D ^b	ISVANIKIYM	Luminal
A3L (270-277)	9,6	0,1	3		4,66	8	K ^b	KSYNMML	Citoplasma
D1R (282-290)	3,5	0,1	13		6,22	9	D ^b	LGYIIRYPV	Citoplasma
B8R (20-27)	20,0	0,1	1		1,23	8	K ^b	TSYKFESV	Luminal
A51R (78-85)	8,3	0,1	4		4,34	8	K ^b	RISRFAANL	Citoplasma
J6R (993-1000)	8,0	0,1	5		5,25	8	K ^b	INFEFVCL	Citoplasma
A8R (70-77)	2,8	0,1	16		5,91	8	K ^b	IHYLFRCV	Citoplasma
C4L (125-132)	1,9	0,1	22		2,32	8	K ^b	LNFRFENV	Citoplasma
E7R (130-137)	1,9	0,1	23		0,77	8	K ^b	STLNFNNL	Citoplasma
B6R (108-116)	1,1	0,1	30		5,54	9	K ^b	LMYDIINSV	Citoplasma
A47L (138-146)	5,1	0,1	8		2,82	9	K ^b	AAFEFINSL	Citoplasma
K3L (6-15)	4,3	0,1	10		1,71	10	D ^b	YSLPNAGDVI	Citoplasma
A42R (88-96)	1,7	0,1	26		4,06	9	D ^b	YAPVSPIVI	Citoplasma

D1R (578-586)	3,1	0,0	15		3,95	9	D ^b	SMYC <u>S</u> KTFL	Citoplasma
B2R (54-62)	7,7	0,0	6		1,86	9	D ^b	YSQV <u>N</u> KRYI	Citoplasma
B1R (92-99)	4,4	0,0	9		4,24	8	K ^b	INVE <u>Y</u> RFL	Citoplasma
F1L (200-207)	1,2	0,0	29		0,80	8	K ^b	STRE <u>Y</u> LKL	Citoplasma

Tabla 23. Resumen de las características de los epítomos de VACV-WR presentados por moléculas de H-2^b.

Información obtenida de *Poxvirus Bioinformatics Resource* y de *UniProt Knowledgebase*. ^a Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ peritoneales activados tras la reestimulación con 10⁻⁸ M del correspondiente péptido sintético. ^b Se utilizó la escala OMH. ^c Se subraya el motivo de anclaje a la molécula de MHC de clase I en posición 5 del péptido. ^d Se indica la posición predicha según *TMHMM Server v. 2.0*. Se resaltan en gris los epítomos que se presentan de forma independiente de TAP.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ahn, K., Meyer, T. H., Uebel, S., Sempe, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P. A., Fruh, K., Tampe, R. (1996). Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus protein ICP47. *EMBO J.* **15**:3247-3255.

Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J. H. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y., Fruh, K. (1997). The er-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**:613-621.

Akram, A., Inman, R. D. (2012). Immunodominance: a pivotal principle in host response to viral infections. *Clin. Immunol.* **143**:99-115.

Alzhanova, D., Edwards, D. M., Hammarlund, E., Scholz, I. G., Horst, D., Wagner, M. J., Upton, C., Wiertz, E. J., Slifka, M. K., Fruh, K. (2009). Cowpox virus inhibits the transporter associated with antigen processing to evade T cell recognition. *Cell Host. Microbe* **6**:433-445.

Anderson, K., Cresswell, P., Gammon, M., Hermes, J., Williamson, A., Zweerink, H. (1991). Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* **174**:489-492.

Anton, L. C., Snyder, H. L., Bennink, J. R., Vinitsky, A., Orlowski, M., Porgador, A., Yewdell, J. W. (1998). Dissociation of proteasomal degradation of biosynthesized viral proteins from generation of MHC class I-associated antigenic peptides. *J. Immunol.* **160**:4859-4868.

Bacik, I., Cox, J. H., Anderson, R., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. (1994). TAP (transporter associated with antigen processing)-independent presentation of endogenously synthesized peptides is enhanced by endoplasmic reticulum insertion sequences located at the amino- but not carboxyl-terminus of the peptide. *J. Immunol.* **152**:381-387.

Badovinac, V. P., Messingham, K. A., Jabbari, A., Haring, J. S., Harty, J. T. (2005). Accelerated CD8⁺ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat. Med.* **11**:748-756.

Becker, T. C., Coley, S. M., Wherry, E. J., Ahmed, R. (2005). Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *J. Immunol.* **174**:1269-1273.

Bell, M. J., Abbott, R. J., Croft, N. P., Hislop, A. D., Burrows, S. R. (2009). An HLA-A2-restricted T-cell epitope mapped to the BNLF2a immune evasion protein of Epstein-Barr virus that inhibits TAP. *J Virol* **83**:2783-2788.

Belz, G. T., Xie, W., Doherty, P. C. (2001). Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza a virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J. Immunol.* **166**:4627-4633.

Bembridge, G. P., López, J. A., Cook, R., Melero, J. A., Taylor, G. (1998). Recombinant vaccinia virus coexpressing the F protein of respiratory syncytial virus (RSV) and interleukin-4 (IL-4) does not inhibit the development of RSV-specific memory cytotoxic T lymphocytes, whereas priming is diminished in the presence of high levels of IL-2 or gamma interferon. *J. Virol.* **72**:4080-4087.

Beninga, J., Rock, K. L., Goldberg, A. L. (1998). Interferon- γ can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* **273**:18734-18742.

Bland, F. A., Lemberg, M. K., McMichael, A. J., Martoglio, B., Braud, V. M. (2003). Requirement of the proteasome for the trimming of signal peptide-derived epitopes presented by the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule HLA-E. *J. Biol. Chem.* **278**:33747-33752.

Brunner, K. T., Mauel, J., Cerottini, J. C., Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**:181-196.

Burgevin, A., Saveanu, L., Kim, Y., Barilleau, E., Kotturi, M., Sette, A., van Endert, P., Peters, B. (2008). A detailed analysis of the murine TAP transporter substrate specificity. *PLoS. ONE.* **3**:e2402.

Burrows, J. M., Bell, M. J., Brennan, R., Miles, J. J., Khanna, R., Burrows, S. R. (2007). Preferential binding of unusually long peptides to MHC class I and its influence on the selection of target peptides for T cell recognition. *Mol. Immunol.*

Byun, M., Verweij, M. C., Pickup, D. J., Wiertz, E. J., Hansen, T. H., Yokoyama, W. M. (2009). Two mechanistically distinct immune evasion proteins of cowpox virus combine to avoid antiviral CD8 T cells. *Cell Host. Microbe* **6**:422-432.

Chang, J., Srikiatkachorn, A., Braciale, T. J. (2001). Visualization and characterization of respiratory syncytial virus F-specific CD8 $^{+}$ T cells during experimental virus infection. *J. Immunol.* **167**:4254-4260.

Chang, S. C., Momburg, F., Bhutani, N., Goldberg, A. L. (2005). The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:17107-17112.

Chemali, M., Radtke, K., Desjardins, M., English, L. (2011). Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cell Mol. Life Sci.* **68**:1533-1541.

Chen, W., Antón, L. C., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. (2000). Dissecting the multifactorial causes of immunodominance in class I-restricted T cell responses to viruses. *Immunity* **12**:83-93.

Chung, C. S., Chen, C. H., Ho, M. Y., Huang, C. Y., Liao, C. L., Chang, W. (2006). Vaccinia virus proteome: identification of proteins in vaccinia virus intracellular mature virion particles. *J. Virol.* **80**:2127-2140.

Collins, E. J., Garboczi, D. N., Wiley, D. C. (1994). Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* **371**:626-629.

Condit, R. C., Moussatche, N., Traktman, P. (2006). In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv. Virus Res.* **66**:31-124.

Coupar, B. E., Andrew, M. E., Both, G. W., Boyle, D. B. (1986). Temporal regulation of influenza hemagglutinin expression in vaccinia virus recombinants and effects on the immune response. *Eur. J. Immunol.* **16**:1479-1487.

Croft, N. P., Shannon-Lowe, C., Bell, A. I., Horst, D., Kremmer, E., Rensing, M. E., Wiertz, E. J., Middeldorp, J. M., Rowe, M., Rickinson, A. B., Hislop, A. D. (2009). Stage-specific inhibition of MHC class I presentation by the Epstein-Barr virus BNLF2a protein during virus lytic cycle. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000490.

Crotzer, V. L., Blum, J. S. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J. Immunol.* **182**:3335-3341.

Crozat, K., Guiton, R., Guillems, M., Henri, S., Baranek, T., Schwartz-Cornil, I., Malissen, B., Dalod, M. (2010). Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol. Rev.* **234**:177-198.

Dales, S., SIMINOVITCH, L. (1961). The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **10**:475-503.

de la Salle, H., Hanau, D., Fricker, D., Urlacher, A., Kelly, A., Salamero, J., Powis, S. H., Donato, L., Bausinger, H., Laforet, M., Jeras, M., Spehner, D., Bieber, T., Falkenrodt, A., Cazenave, J. P., Trowsdale, J., Tongio, M. M. (1994). Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* **265**:237-241.

de la Salle, H., Houssaint, E., Peyrat, M. A., Arnold, D., Salamero, J., Pinczon, D., Stevanovic, S., Bausinger, H., Fricker, D., Gomard, E., Biddison, W., Lehner, P., Uytdehaag, F., Sasportes, M., Donato, L., Rammensee, H. G., Cazenave, J. P., Hanau, D., Tongio, M. M., Bonneville, M. (1997). Human peptide transporter deficiency. Importance of HLA-B in the presentation of TAP-independent EBV antigens. *J. Immunol.* **158**:4555-4563.

Del Val, M., Volkmer, H., Rothbard, J. B., Jonjic, S., Messerle, M., Schickedanz, J., Reddehase, M. J., Koszinowski, U. H. (1988). Molecular basis for cytolytic T-lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus immediate-early protein pp89. *J. Virol.* **62**:3965-3972.

Del Val, M., López, D. (2002). Multiple proteases process viral antigens for presentation by MHC class I molecules to CD8⁺ T lymphocytes. *Mol. Immunol.* **39**:235-247.

Del Val, M., Iborra, S., Ramos, M., Lázaro, S. (2011). Generation of MHC class I ligands in the secretory and vesicular pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**:1543-1552.

Diekmann, J., Adamopoulou, E., Beck, O., Rauser, G., Lurati, S., Tenzer, S., Einsele, H., Rammensee, H. G., Schild, H., Topp, M. S. (2009). Processing of two latent membrane protein 1 MHC class I epitopes requires tripeptidyl peptidase II involvement. *J Immunol.* **183**:1587-1597.

Diez-Rivero, C. M., Reche, P. A. (2012). CD8 T cell epitope distribution in viruses reveals patterns of protein biosynthesis. *PLoS. ONE.* **7**:e43674.

Dolan, B. P., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. (2011). Translating DRiPs: progress in understanding viral and cellular sources of MHC class I peptide ligands. *Cell Mol. Life Sci.* **68**:1481-1489.

Eisenlohr, L. C., Bacik, I., Bennink, J. R., Bernstein, K., Yewdell, J. W. (1992). Expression of a membrane protease enhances presentation of endogenous antigens to MHC class I-restricted T lymphocytes. *Cell* **71**:963-972.

El Hage, F., Stroobant, V., Vergnon, I., Baurain, J. F., Echchakir, H., Lazar, V., Chouaib, S., Coulie, P. G., Mami-Chouaib, F. (2008). Preprocalcitonin signal peptide generates a cytotoxic T lymphocyte-defined tumor epitope processed by a proteasome-independent pathway. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* **105**:10119-10124.

Elliott, T., Willis, A., Cerundolo, V., Townsend, A. (1995). Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* **181**:1481-1491.

English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippe, R., Desjardins, M. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* **10**:480-487.

Evnochidou, I., Momburg, F., Papakyriakou, A., Chroni, A., Leondiadis, L., Chang, S. C., Goldberg, A. L., Stratikos, E. (2008). The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS. ONE.* **3**:e3658.

Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-296.

Firat, E., Huai, J., Saveanu, L., Gaedicke, S., Aichele, P., Eichmann, K., van Endert, P., Niedermann, G. (2007). Analysis of Direct and Cross-Presentation of Antigens in TPPII Knockout Mice. *J Immunol.* **179**:8137-8145.

Fischer, M. A., Norbury, C. C. (2007). Initiation of primary anti-vaccinia virus immunity in vivo. *Immunol. Res* **37**:113-133.

Fruh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempe, P., van Endert, P. M., Tampe, R., Peterson, P. A., Yang, Y. (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* **375**:415-418.

Gadola, S. D., Moins-Teisserenc, H. T., Trowsdale, J., Gross, W. L., Cerundolo, V. (2000). TAP deficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **121**:173-178.

Galocha, B., Hill, A., Barnett, B. C., Dolan, A., Raimondi, A., Cook, R. F., Brunner, J, McGeoch, D. J., Ploegh, H. L. (1997). The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC) encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH2 terminal 35 residues. *J. Exp. Med.* **185**:1565-1572.

Garcia-Arriaza, J., Najera, J. L., Gomez, C. E., Tewabe, N., Sorzano, C. O., Calandra, T., Roger, T., Esteban, M. (2011). A candidate HIV/AIDS vaccine (MVA-B) lacking vaccinia virus gene C6L enhances memory HIV-1-specific T-cell responses. *PLoS. ONE.* **6**:e24244.

Garcia-Medel, N., Sanz, A., Barnea, E., Admon, A., Lopez de Castro, J. A. (2011). The origin of proteasome-inhibitor resistant HLA class I peptidomes: a study with HLA-A*68:01. *Mol. Cell Proteomics.*

Gasteiger, G., Kastenmuller, W., Ljapoci, R., Sutter, G., Drexler, I. (2007). Cross-priming of cytotoxic T cells dictates antigen requisites for modified vaccinia virus Ankara vector vaccines. *J Virol* **81**:11925-11936.

Ghanem, E., Fritzsche, S., Al-Balushi, M., Hashem, J., Ghuneim, L., Thomer, L., Kalbacher, H., van, E. P., Wiertz, E., Tampe, R., Springer, S. (2010). The transporter associated with antigen processing (TAP) is active in a post-ER compartment. *J. Cell Sci.* **123**:4271-4279.

Gil-Torregrosa, B. C., Castaño, A. R., Del Val, M. (1998). Major histocompatibility complex class I viral antigen processing in the secretory pathway defined by the *trans*-Golgi network protease furin. *J. Exp. Med.* **188**:1105-1116.

Gil-Torregrosa, B. C., Castaño, A. R., López, D., Del Val, M. (2000). Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic* **1**:641-651.

Grommé, M., Uytdehaag, F. G. C. M., Janssen, H., Calafat, J., van Binnendijk, R. S., Kenter, M. J. H., Tulp, A., Verwoerd, D., Neefjes, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:10326-10331.

Gueguen, M., Biddison, W. E., Long, E. O. (1994). T cell recognition of an HLA-A2-restricted epitope derived from a cleaved signal sequence. *J Exp. Med* **180**:1989-1994.

Guil, S., Rodríguez-Castro, M., Aguilar, F., Villasevil, E. M., Antón, L. C., Del Val, M. (2006). Need for tripeptidyl-peptidase II in major histocompatibility complex class I viral antigen processing when proteasomes are detrimental. *J. Biol. Chem.* **281**:39925-39934.

Haeryfar, S. M., DiPaolo, R. J., Tschärke, D. C., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. (2005). Regulatory T cells suppress CD8+ T cell responses induced by direct priming and cross-priming and moderate immunodominance disparities. *J Immunol.* **174**:3344-3351.

Hammer, G. E., Gonzalez, F., James, E., Nolla, H., Shastri, N. (2006). In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.* ..

Hammond, S. A., Bollinger, R. C., Tobery, T. W., Siliciano, R. F. (1993). Transporter-independent processing of HIV-1 envelope protein for recognition by CD8⁺ T cells. *Nature* **364**:158-161.

Hammond, S. A., Johnson, R. P., Kalams, S. A., Walker, B. D., Takiguchi, M., Safritz, J. T., Koup, R. A., Siliciano, R. F. (1995). An epitope-selective, transporter associated with antigen presentation (TAP)-1/2-independent pathway and a more general TAP-1/2-dependent antigen-processing pathway allow recognition of the HIV-1 envelope glycoprotein by CD8⁺ CTL. *J. Immunol.* **154**:6140-6156.

Hearn, A., York, I. A., Rock, K. L. (2009). The specificity of trimming of MHC class I-presented peptides in the endoplasmic reticulum. *J Immunol.* **183**:5526-5536.

Henderson, R. A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D. F., Engelhard, V. H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* **255**:1264-1266.

Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H., Johnson, D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**:411-415.

Horst, D., van, L. D., Croft, N. P., Garstka, M. A., Hislop, A. D., Kremmer, E., Rickinson, A. B., Wiertz, E. J., Rensing, M. E. (2009). Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted antigen presentation. *J. Immunol.* **182**:2313-2324.

Huai, J., Firat, E., Nil, A., Million, D., Gaedicke, S., Kanzler, B., Freudenberg, M., van Endert, P., Kohler, G., Pahl, H. L., Aichele, P., Eichmann, K., Niedermann, G. (2008). Activation of cellular death programs associated with immunosenescence-like phenotype in TPPII knockout mice. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* **105**:5177-5182.

Huang, L., Kuhls, M. C., Eisenlohr, L. C. (2011). Hydrophobicity as a driver of MHC class I antigen processing. *EMBO J.* **30**:1634-1644.

Husain, M., Weisberg, A. S., Moss, B. (2006). Existence of an operative pathway from the endoplasmic reticulum to the immature poxvirus membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:19506-19511.

----- (2007). Sequence-independent targeting of transmembrane proteins synthesized within vaccinia virus factories to nascent viral membranes. *J. Virol.* **81**:2646-2655.

Infantes, S., Samino, Y., Lorente, E., Jiménez, M., García, R., Del Val, M., López, D. (2010). H-2Ld class I molecule protects an HIV N-extended epitope from in vitro trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing. *J Immunol.* **184**:3351-3355.

Johnson, J. A., Gray, M. O., Karliner, J. S., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D. (1996). An improved permeabilization protocol for the introduction of peptides into cardiac myocytes. Application to protein kinase C research. *Circ. Res.* **79**:1086-1099.

Johnstone, C., de León, P., Medina, F., Melero, J. A., García-Barreno, B., Del Val, M. (2004). Shifting immunodominance pattern of two cytotoxic T-lymphocyte epitopes in the F glycoprotein of the Long strain of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* **85**:3229-3238.

Johnstone, C., Del Val, M. (2007). Traffic of proteins and peptides across membranes for immunosurveillance by CD8⁺ T Lymphocytes: A topological challenge. *Traffic* **8**:1486-1494.

Johnstone, C., Guil, S., García-Barreno, B., López, D., Melero, J. A., Del Val, M. (2008). Relevance of viral context and diversity of antigen processing routes for respiratory syncytial virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Gen. Virol.* **89**:2194-2203.

Kanaseki, T., Blanchard, N., Hammer, G. E., Gonzalez, F., Shastri, N. (2006). ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity.* **25**:795-806.

Kastenmuller, W., Gasteiger, G., Gronau, J. H., Baier, R., Ljapoci, R., Busch, D. H., Drexler, I. (2007). Cross-competition of CD8⁺ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. *J Exp. Med* **204**:2187-2198.

Katsafanas, G. C., Moss, B. (2007). Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host. Microbe* **2**:221-228.

Kawahara, M., York, I. A., Hearn, A., Farfan, D., Rock, K. L. (2009). Analysis of the Role of Tripeptidyl Peptidase II in MHC Class I Antigen Presentation In Vivo. *J Immunol.* **183**:6069-6077.

Kessler, J. H., Khan, S., Seifert, U., Le Gall, S., Chow, K. M., Paschen, A., Bres-Vloemans, S. A., de Ru, A., van Montfoort, N., Franken, K. L., Benckhuijsen, W. E., Brooks, J. M., van Hall, T., Ray, K., Mulder, A., Doxiadis, I. I., van Swieten, P. F., Overkleeft, H. S., Prat, A., Tomkinson, B., Neefjes, J., Kloetzel, P. M., Rodgers, D. W., Hersh, L. B., Drijfhout, J. W., van Veelen, P. A., Ossendorp, F., Melief, C. J. (2011). Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat. Immunol.* **12**:45-53.

Kettle, S., Alcamí, A., Khanna, A., Ehret, R., Jassoy, C., Smith, G. L. (1997). Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1 β -converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1 β -induced fever. *J. Gen. Virol.* **78**:677-685.

Khanna, R., Burrows, S. R., Moss, D. J., Silins, S. L. (1996). Peptide transporter (TAP-1 and TAP-2)-independent endogenous processing of Epstein-Barr virus (EBV) latent

membrane protein 2A - implications for cytotoxic T-Lymphocyte control of EBV-associated malignancies. *J. Virology* **70**:5357-5362.

Kim, S., Lee, S., Shin, J., Kim, Y., Evnouchidou, I., Kim, D., Kim, Y. K., Kim, Y. E., Ahn, J. H., Riddell, S. R., Stratikos, E., Kim, V. N., Ahn, K. (2011). Human cytomegalovirus microRNA miR-US4-1 inhibits CD8(+) T cell responses by targeting the aminopeptidase ERAP1. *Nat. Immunol.* **12**:984-991.

Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M., Goldberg, A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes - Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274**:3363-3371.

Kloetzel, P. M., Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **16**:76-81.

Kochan, G., Krojer, T., Harvey, D., Fischer, R., Chen, L., Vollmar, M., von, D. F., Kavanagh, K. L., Brown, M. A., Bowness, P., Wordsworth, P., Kessler, B. M., Oppermann, U. (2011). Crystal structures of the endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 (ERAP1) reveal the molecular basis for N-terminal peptide trimming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**:7745-7750.

Kohonen-Corish, M. R., King, N. J., Woodhams, C. E., Ramshaw, I. A. (1990). Immunodeficient mice recover from infection with vaccinia virus expressing interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* **20**:157-161.

Koopmann, J. O., Albring, J., Hüter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hämmerling, G. J., Momburg, F. (2000). Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*. **13**:117-127.

Koppers-Lalic, D., Reits, E. A., Rensing, M. E., Lipinska, A. D., Abele, R., Koch, J., Marcondes, R. M., Admiraal, P., van Leeuwen, D., Bienkowska-Szewczyk, K., Mettenleiter, T. C., Rijsewijk, F. A., Tampe, R., Neefjes, J., Wiertz, E. J. (2005). Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* **102**:5144-5149.

Kuzushima, K., Hayashi, N., Kudoh, A., Akatsuka, Y., Tsujimura, K., Morishima, Y., Tsurumi, T. (2003). Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells. *Blood* **101**:1460-1468.

Lautscham, G., Mayrhofer, S., Taylor, G., Haigh, T., Leese, A., Rickinson, A., Blake, N. (2001). Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8⁺ T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J. Exp. Med.* **194**:1053-1068.

Lautscham, G., Rickinson, A., Blake, N. (2003a). TAP-independent antigen presentation on MHC class I molecules: lessons from Epstein-Barr virus. *Microbes. Infect.* **5**:291-299.

Lautscham, G., Haigh, T., Mayrhofer, S., Taylor, G., Croom-Carter, D., Leese, A., Gadola, S., Cerundolo, V., Rickinson, A., Blake, N. (2003b). Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8⁺ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *J. Virol.* **77**:2757-2761.

Lauvau, G., Kakimi, K., Niedermann, G., Ostankovitch, M., Yotnda, P., Firat, H., Chisari, F. V., van Endert, P. M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J. Exp. Med.* **190**:1227-1240.

Lee, S. P., Thomas, W. A., Blake, N. W., Rickinson, A. B. (1996). Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane- spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *European Journal of Immunology* **26**:1875-1883.

Leonhardt, R. M., Fiegl, D., Rufer, E., Karger, A., Bettin, B., Knittler, M. R. (2010). Post-Endoplasmic Reticulum Rescue of Unstable MHC Class I Requires Proprotein Convertase PC7. *J Immunol.* **184**:2985-2998.

Lévy, F., Burri, L., Morel, S., Peitrequin, A. L., Lévy, N., Bachi, A., Hellman, U., Van den Eynde, B. J., Servis, C. (2002). The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J. Immunol.* **169**:4161-4171.

Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schweizer, A., Berger, E. G., Hauri, H. P., Yuan, L. C., Klausner, R. D. (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**:821-836.

López, D., Del Val, M. (1997). Selective involvement of proteasomes and cysteine proteases in MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* **159**:5769-5772.

López, D., Garcia-Calvo, M., Smith, G., Del Val, M. (2010). Caspases in virus-infected cells contribute to recognition by CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **184**:5193-5199.

Lorente, E., Infantes, S., Barnea, E., Beer, I., Garcia, R., Lasala, F., Jimenez, M., Admon, A., López, D. (2011). TAP-independent human histocompatibility complex-Cw1 antigen processing of an HIV envelope protein conserved peptide. *AIDS* **25**:265-269.

Luckey, C. J., King, G. M., Marto, J. A., Venketeswaran, S., Maier, B. F., Crotzer, V. L., Colella, T. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Engelhard, V. H. (1998). Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: Evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol. *J. Immunol.* **161**:112-121.

Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**:77-92.

Maruri-Avidal, L., Domi, A., Weisberg, A. S., Moss, B. (2011). Participation of vaccinia virus I2 protein in the formation of crescent membranes and immature virions. *J. Virol.* **85**:2504-2511.

Medina, F., Ramos, M., Iborra, S., de León, P., Rodríguez-Castro, M., Del Val, M. (2009). Furin-processed antigens targeted to the secretory route elicit functional TAP1^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes *in vivo*. *J. Immunol.* **183**:4639-4647.

Merzougui, N., Kratzer, R., Saveanu, L., van Endert, P. (2011). A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep.* **12**:1257-1264.

Moss, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:11341-11348.

----- (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**:48-54.

Mota, B. E., Gallardo-Romero, N., Trindade, G., Keckler, M. S., Karem, K., Carroll, D., Campos, M. A., Vieira, L. Q., da Fonseca, F. G., Ferreira, P. C., Bonjardim, C. A., Damon, I. K., Kroon, E. G. (2011). Adverse events post smallpox-vaccination: insights from tail scarification infection in mice with Vaccinia virus. *PLoS. ONE.* **6**:e18924.

Moutaftsi, M., Peters, B., Pasquetto, V., Tschärke, D. C., Sidney, J., Bui, H. H., Grey, H., Sette, A. (2006). A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T CD8⁺ cell responses to vaccinia virus. *Nat. Biotechnol.* **24**:817-819.

Moutaftsi, M., Salek-Ardakani, S., Croft, M., Peters, B., Sidney, J., Grey, H., Sette, A. (2009). Correlates of protection efficacy induced by vaccinia virus-specific CD8⁺ T-cell epitopes in the murine intranasal challenge model. *Eur. J. Immunol.* **39**:717-722.

Munks, M. W., Gold, M. C., Zajac, A. L., Doom, C. M., Morello, C. S., Spector, D. H., Hill, A. B. (2006). Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J Immunol.* **176**:3760-3766.

Münz, C. (2010). Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Curr. Opin. Immunol.* **89-93**.

Nagarajan, N. A., Gonzalez, F., Shastri, N. (2012). Nonclassical MHC class Ib-restricted cytotoxic T cells monitor antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **13**:579-586.

Neumeister, C., Nanan, R., Cornu, T. I., Lüder, C. G. K., ter Meulen, V., Naim, H., Niewiesk, S. (2001). Measles virus and canine distemper virus target proteins into a TAP-independent MHC class I-restricted antigen-processing pathway. *J. Gen. Virol.* **82**:441-447.

Nguyen, T. T., Chang, S. C., Evnouchidou, I., York, I. A., Zikos, C., Rock, K. L., Goldberg, A. L., Stratikos, E., Stern, L. J. (2011). Structural basis for antigenic peptide precursor

processing by the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**:604-613.

Norbury, C. C., Princiotta, M. F., Bacik, I., Brutkiewicz, R. R., Wood, P., Elliott, T., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. (2001). Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8⁺ T cells *in vivo*. *J. Immunol.* **166**:4355-4362.

Oliveira, C. C., van Veelen, P. A., Querido, B., de Ru, A., Sluijter, M., Laban, S., van der Burg, S. H., Offringa, R., van Hall, T. (2009). The nonpolymorphic MHC Qa-1b mediates CD8⁺ T cell surveillance of antigen-processing defects. *J. Exp. Med.* **207**:207-221.

Oliveira, C. C., Querido, B., Sluijter, M., Derbinski, J., van der Burg, S. H., van Hall, T. (2011). Peptide transporter TAP mediates between competing antigen sources generating distinct surface MHC class I peptide repertoires. *Eur J Immunol.* **41**:3114-3124.

Oseroff, C., Kos, F., Bui, H. H., Peters, B., Pasquetto, V., Glenn, J., Palmore, T., Sidney, J., Tscharke, D. C., Bennink, J. R., Southwood, S., Grey, H. M., Yewdell, J. W., Sette, A. (2005). HLA class I-restricted responses to vaccinia recognize a broad array of proteins mainly involved in virulence and viral gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:13980-13985.

Oseroff, C., Peters, B., Pasquetto, V., Moutafsi, M., Sidney, J., Panchanathan, V., Tscharke, D. C., Maillere, B., Grey, H., Sette, A. (2008). Dissociation between epitope hierarchy and immunoprevalence in CD8 responses to vaccinia virus western reserve. *J. Immunol.* **180**:7193-7202.

Paliard, X., Doe, B., Selby, M. J., Hartog, K., Lee, A. Y., Burke, R. L., Walker, C. M. (2001). Induction of herpes simplex virus gB-specific cytotoxic T lymphocytes in TAP1-deficient mice by genetic immunization but not HSV infection. *Virology* **282**:56-64.

Parcej, D., Tampe, R. (2010). ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **6**:572-580.

Parker, K. C., Bednarek, M. A., Coligan, J. E. (1994). Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J. Immunol.* **152**:163-175.

Parmentier, N., Stroobant, V., Colau, D., de Diesbach, P., Morel, S., Chapiro, J., van Endert, P., Van den Eynde, B. J. (2010). Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nat. Immunol.* **11**:449-454.

Pasquetto, V., Bui, H. H., Giannino, R., Mirza, F., Sidney, J., Oseroff, C., Tscharke, D. C., Irvine, K., Bennink, J. R., Peters, B., Southwood, S., Cerundolo, V., Grey, H., Yewdell, J. W., Sette, A. (2005). HLA-A*0201, HLA-A*1101, and HLA-B*0702 transgenic mice recognize numerous poxvirus determinants from a wide variety of viral gene products. *J. Immunol.* **175**:5504-5515.

- Payne, L. G.** (1980). Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *J. Gen. Virol.* **50**:89-100.
- Perdiguero, B., Esteban, M.** (2009). The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**:581-598.
- Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., van Endert, P. M., Holzhütter, H. G.** (2003). Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J. Immunol.* **171**:1741-1749.
- Powis, S. J., Young, L. L., Joly, E., Barker, P. J., Richardson, L., Brandt, R. P., Melief, C. J., Howard, J. C., Butcher, G. W.** (1996). The rat *cim* effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* **4**:159-165.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J. R., Yewdell, J. W.** (2003). Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* **18**:343-354.
- Prlic, M., Gibbs, J., Jameson, S. C.** (2005). Characteristics of NK cell migration early after vaccinia infection. *J. Immunol.* **175**:2152-2157.
- Ramírez, J. C., Gherardi, M. M., Esteban, M.** (2000). Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J. Virol.* **74**:923-933.
- Rammensee, H. G., Bachmann, J., Emmerich, N. P. N., Bachor, O. A., Stevanovic, S.** (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**:213-219.
- Ratnikov, B. I., Rozanov, D. V., Postnova, T. I., Baciú, P. G., Zhang, H., DiScipio, R. G., Chestukhina, G. G., Smith, J. W., Deryugina, E. I., Strongin, A. Y.** (2002). An alternative processing of integrin $\alpha(v)$ subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* **277**:7377-7385.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W., Neefjes, J.** (2003). Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* **18**:97-108.
- Reits, E., Neijssen, J., Herberts, C., Benckhuijsen, W., Janssen, L., Drijfhout, J. W., Neefjes, J.** (2004). A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. **20**:495-506.
- Resch, W., Hixson, K. K., Moore, R. J., Lipton, M. S., Moss, B.** (2007). Protein composition of the vaccinia virus mature virion. *Virology* **358**:233-247.

Roberts, K. L., Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* **16**:472-479.

Rolph, M. S., Kaufmann, S. H. (2000). Partially TAP-independent protection against *Listeria monocytogenes* by H2-M3-restricted CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* **165**:4575-4580.

Samino, Y., López, D., Guil, S., Saveanu, L., van Endert, P. M., Del Val, M. (2006). A long N-terminal-extended nested set of abundant and antigenic major histocompatibility complex class I natural ligands from HIV envelope protein. *J. Biol. Chem.* **281**:6358-6365.

Sandberg, J. K., Chambers, B. J., van Kaer, L., Karre, K., Ljunggren, H. G. (1996). TAP1-deficient mice select a CD8⁺ T cell repertoire that displays both diversity and peptide specificity. *Eur. J Immunol.* **26**:288-293.

Saric, T., Beninga, J., Graef, C. I., Akopian, T. N., Rock, K. L., Goldberg, A. L. (2001). Major histocompatibility complex class I-presented antigenic peptides are degraded in cytosolic extracts primarily by thimet oligopeptidase. *J. Biol. Chem.* **276**:36474-36481.

Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., Goldberg, A. L. (2002). An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* **3**:1169-1176.

Saric, T., Graef, C. I., Goldberg, A. L. (2004). Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases. *J. Biol. Chem.* **279**:46723-46732.

Satheshkumar, P. S., Anton, L. C., Sanz, P., Moss, B. (2009). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system prevents vaccinia virus DNA replication and expression of intermediate and late genes. *J Virol* **83**:2469-2479.

Saulquin, X., Bodinier, M., Peyrat, M. A., Hislop, A., Scotet, E., Lang, F., Bonneville, M., Houssaint, E. (2001). Frequent recognition of BCRF1, a late lytic cycle protein of Epstein-Barr virus, in the HLA-B*2705 context: evidence for a TAP-independent processing. *Eur. J. Immunol.* **31**:708-715.

Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., López, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., van Endert, P. M. (2005). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* **6**:689-697.

Schatz, M. M., Peters, B., Akkad, N., Ullrich, N., Martinez, A. N., Carroll, O., Bulik, S., Rammensee, H. G., van Endert, P., Holzhutter, H. G., Tenzer, S., Schild, H. (2008). Characterizing the N-terminal processing motif of MHC class I ligands. *J Immunol.* **180**:3210-3217.

Schirmbeck, R., Reimann, J. (1994). Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur. J. Immunol.* **24**:1478-1486.

----- (2002). Alternative processing of endogenous or exogenous antigens extends the immunogenic, H-2 class I-restricted peptide repertoire. *Mol. Immunol.* **39**:249-259.

Schlosser, E., Otero, C., Wuensch, C., Kessler, B., Edelmann, M., Brunisholz, R., Drexler, I., Legler, D. F., Groettrup, M. (2007). A novel cytosolic class I antigen-processing pathway for endoplasmic-reticulum-targeted proteins. *EMBO Rep.* **8**:945-951.

Seifert, U., Marañón, C., Shmueli, A., Desoutter, J. F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P. M., Reiss, Y., Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* **4**:375-379.

Serwold, T., Gaw, S., Shastri, N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat. Immunol.* **2**:644-651.

Serwold, T., González, F., Kim, J., Jacob, R., Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* **419**:480-483.

Sewell, A. K., Price, D. A., Teisserenc, H., Booth, B. L., Jr., Gileadi, U., Flavin, F. M., Trowsdale, J., Phillips, R. E., Cerundolo, V. (1999). IFN- γ exposes a cryptic cytotoxic T lymphocyte epitope in HIV-1 reverse transcriptase. *J. Immunol.* **162**:7075-7079.

Shastri, N., Cardinaud, S., Schwab, S. R., Serwold, T., Kunisawa, J. (2005). All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol. Rev.* **207**:31-41.

Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M., Rock, K. L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation *in vivo*. *Immunity* **21**:155-165.

Shen, X. Z., Billet, S., Lin, C., Okwan-Duodu, D., Chen, X., Lukacher, A. E., Bernstein, K. E. (2011). The carboxypeptidase ACE shapes the MHC class I peptide repertoire. *Nat. Immunol.*

Sigal, L. J., Rock, K. L. (2000). Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J. Exp. Med.* **192**:1143-1150.

Sijts, E. J., Kloetzel, P. M. (2011). The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell Mol. Life Sci.* **68**:1491-1502.

Smith, G. L., Symons, J. A., Khanna, A., Vanderplasschen, A., Alcamí, A. (1997). Vaccinia virus immune evasion. *Immunol. Rev.* **159**:137-154.

Snyder, H. L., Bacík, I., Bennink, J. R., Kearns, G., Behrens, T. W., Bächli, T., Orlowski, M., Yewdell, J. W. (1997). Two novel routes of transporter associated with antigen

processing (TAP)-independent major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* **186**:1087-1098.

Snyder, H. L., Bacík, I., Yewdell, J. W., Behrens, T. W., Bennink, J. R. (1998). Promiscuous liberation of MHC-class I-binding peptides from the C termini of membrane and soluble proteins in the secretory pathway. *Eur. J. Immunol.* **28**:1339-1346.

Snyder, J. T., Belyakov, I. M., Dzutsev, A., Lemonnier, F., Berzofsky, J. A. (2004). Protection against lethal vaccinia virus challenge in HLA-A2 transgenic mice by immunization with a single CD8⁺ T-cell peptide epitope of vaccinia and variola viruses. *J. Virol.* **78**:7052-7060.

Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11**:2407-2414.

Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schröter, C., Thompson, M. W., Hersh, L. B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Schild, H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* **1**:413-418.

Suri, A., Walters, J. J., Levisetti, M. G., Gross, M. L., Unanue, E. R. (2006). Identification of naturally processed peptides bound to the class I MHC molecule H-2K^d of normal and TAP-deficient cells. *Eur. J. Immunol.* **36**:544-557.

Sutter, G., Wyatt, L. S., Foley, P. L., Bennink, J. R., Moss, B. (1994). A recombinant vector derived from the host range- restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* **12**:1032-1040.

Sweet, R. M., Eisenberg, D. (1983). Correlation of sequence hydrophobicities measures similarity in three-dimensional protein structure. *J. Mol. Biol.* **171**:479-488.

Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J. C., Cox, W. I., Davis, S. W., van der, H. J., Meignier, B., Riviere, M., . (1992). NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology* **188**:217-232.

Teale, A., Campbell, S., Van Buuren, N., Magee, W. C., Watmough, K., Couturier, B., Shipclark, R., Barry, M. (2009). Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. *J Virol* **83**:2099-2108.

Terajima, M., Cruz, J., Leporati, A. M., Demkowicz, W. E., Jr., Kennedy, J. S., Ennis, F. A. (2006). Identification of vaccinia CD8⁺ T-cell epitopes conserved among vaccinia and variola viruses restricted by common MHC class I molecules, HLA-A2 or HLA-B7. *Hum. Immunol.* **67**:512-520.

Tewalt, E. F., Grant, J. M., Granger, E. L., Palmer, D. C., Heuss, N. D., Gregerson, D. S., Restifo, N. P., Norbury, C. C. (2009). Viral sequestration of antigen subverts cross presentation to CD8(+) T cells. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000457.

Tey, S. K., Khanna, R. (2012). Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood*.

Thomas, S., Kolumam, G. A., Murali-Krishna, K. (2007). Antigen presentation by nonhemopoietic cells amplifies clonal expansion of effector CD8 T cells in a pathogen-specific manner. *J Immunol.* **178**:5802-5811.

Tiwari, N., Garbi, N., Reinheckel, T., Moldenhauer, G., Hammerling, G. J., Momburg, F. (2007). A transporter associated with antigen-processing independent vacuolar pathway for the MHC class I-mediated presentation of endogenous transmembrane proteins. *J. Immunol.* **178**:7932-7942.

Tolonen, N., Doglio, L., Schleich, S., Krijnse, L. J. (2001). Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol. Biol. Cell* **12**:2031-2046.

Tomazin, R., Hill, A. B., Jugovic, P., York, I., van Endert, P. M., Ploegh, H. L., Andrews, D. W., Johnson, D. C., Herpes simplex virus, Icp47, Peptide binding site, Tap. (1996). Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO Journal* **15**:3256-3266.

Tomkinson, B. (1999). Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem. Sci.* **24**:355-359.

Towne, C. F., York, I. A., Neijssen, J., Karow, M. L., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Neefjes, J. J., Rock, K. L. (2005). Leucine aminopeptidase is not essential for trimming peptides in the cytosol or generating epitopes for MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* **175**:6605-6614.

Towne, C. F., York, I. A., Watkin, L. B., Lazo, J. S., Rock, K. L. (2007). Analysis of the role of bleomycin hydrolase in antigen presentation and the generation of CD8 T cell responses. *J Immunol.* **178**:6923-6930.

Towne, C. F., York, I. A., Neijssen, J., Karow, M. L., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Neefjes, J. J., Rock, K. L. (2008). Puromycin-sensitive aminopeptidase limits MHC class I presentation in dendritic cells but does not affect CD8 T cell responses during viral infections. *J Immunol.* **180**:1704-1712.

Tscharke, D. C., Karupiah, G., Zhou, J., Palmore, T., Irvine, K. R., Haeryfar, S. M., Williams, S., Sidney, J., Sette, A., Bennink, J. R., Yewdell, J. W. (2005). Identification of poxvirus CD8⁺ T cell determinants to enable rational design and characterization of smallpox vaccines. *J. Exp. Med.* **201**:95-104.

Tscharke, D. C., Woo, W. P., Sakala, I. G., Sidney, J., Sette, A., Moss, D. J., Bennink, J. R., Karupiah, G., Yewdell, J. W. (2006). Poxvirus CD8⁺ T-cell determinants and cross-reactivity in BALB/c mice. *J. Virol.* **80**:6318-6323.

- Turzynski, A., Mentlein, R.** (1990). Prolyl aminopeptidase from rat brain and kidney. Action on peptides and identification as leucyl aminopeptidase. *Eur. J. Biochem.* **190**:509-515.
- Valmori, D., Gileadi, U., Servis, C., Dunbar, P. R., Cerottini, J. C., Romero, P., Cerundolo, V., Lévy, F.** (1999). Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J. Exp. Med.* **189**:895-905.
- van Endert, P. M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J. F.** (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J. Exp. Med.* **182**:1883-1895.
- van Hall, T., Laban, S., Koppers-Lalic, D., Koch, J., Precup, C., Asmawidjaja, P., Offringa, R., Wiertz, E. J.** (2007). The varicellovirus-encoded TAP inhibitor UL49.5 regulates the presentation of CTL epitopes by Qa-1^b. *J. Immunol.* **178**:657-662.
- van Kaer, L., Ashton Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., Tonegawa, S.** (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4⁺8⁺ T cells. *Cell* **71**:1205-1214.
- Verardi, P. H., Jones, L. A., Aziz, F. H., Ahmad, S., Yilma, T. D.** (2001). Vaccinia virus vectors with an inactivated gamma interferon receptor homolog gene (B8R) are attenuated In vivo without a concomitant reduction in immunogenicity. *J. Virol.* **75**:11-18.
- Vinitsky, A., Anton, L. C., Snyder, H. L., Orlowski, M., Bennink, J. R., Yewdell, J. W.** (1997). The generation of MHC class I associated peptides is only partially inhibited by proteasome inhibitors. Involvement of nonproteasomal cytosolic proteases in antigen processing. *J. Immunol.* **159**:554-564.
- Walev, I., Bhakdi, S. C., Hofmann, F., Djonder, N., Valeva, A., Aktories, K., Bhakdi, S.** (2001). Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* **98**:3185-3190.
- Wei, M. L., Cresswell, P.** (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**:443-446.
- Weinzierl, A. O., Rudolf, D., Hillen, N., Tenzer, S., van Endert, P., Schild, H., Rammensee, H. G., Stevanovic, S.** (2008). Features of TAP-independent MHC class I ligands revealed by quantitative mass spectrometry. *Eur J Immunol.* **38**:1503-1510.
- Weiss, B., Hui, K. S., Hui, M., Lajtha, A.** (1988). Amino thiols: synthesis and effect on chicken brain aminopeptidases. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **62**:113-123.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., Ploegh, H. L.** (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction [see comments]. *Nature* **384**:432-438.

- Wölfel, C., Drexler, I., Van Pel, A., Thres, T., Leister, N., Herr, W., Sutter, G., Huber, C., Wolfel, T. (2000).** Transporter (TAP)- and proteasome-independent presentation of a melanoma-associated tyrosinase epitope. *Int. J. Cancer* **88**:432-438.
- Wood, P., Elliott, T. (1998).** Glycan-regulated antigen processing of a protein in the endoplasmic reticulum can uncover cryptic cytotoxic T cell epitopes. *J. Exp. Med.* **188**:773-778.
- Xu, R., Johnson, A. J., Liggitt, D., Bevan, M. J. (2004).** Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *J. Immunol.* **172**:6265-6271.
- Xu, R. H., Remakus, S., Ma, X., Roscoe, F., Sigal, L. J. (2010).** Direct presentation is sufficient for an efficient anti-viral CD8+ T cell response. *PLoS. Pathog.* **6**:e1000768.
- Yan, J., Parekh, V. V., Mendez-Fernandez, Y., Olivares-Villagomez, D., Dragovic, S., Hill, T., Roopenian, D. C., Joyce, S., van Kaer, L. (2006).** In vivo role of ER-associated peptidase activity in tailoring peptides for presentation by MHC class Ia and class Ib molecules. *J. Exp. Med.* **203**:647-659.
- Yang, Z., Bruno, D. P., Martens, C. A., Porcella, S. F., Moss, B. (2010).** Simultaneous high-resolution analysis of vaccinia virus and host cell transcriptomes by deep RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**:11513-11518.
- Yang, Z., Reynolds, S. E., Martens, C. A., Bruno, D. P., Porcella, S. F., Moss, B. (2011).** Expression profiling of the intermediate and late stages of poxvirus replication. *J. Virol.* **85**:9899-9908.
- Yates, N. L., Alexander-Miller, M. A. (2007).** Vaccinia virus infection of mature dendritic cells results in activation of virus-specific naive CD8+ T cells: a potential mechanism for direct presentation. *Virology* **359**:349-361.
- Yellen-Shaw, A. J., Wherry, E. J., Dubois, G. C., Eisenlohr, L. C. (1997).** Point mutation flanking a CTL epitope ablates *in vitro* and *in vivo* recognition of a full-length viral protein. *J. Immunol.* **158**:3227-3234.
- Yewdell, J. W. (2005).** The seven dirty little secrets of major histocompatibility complex class I antigen processing. *Immunol. Rev* **207**:8-18.
- Yewdell, J. W., Nicchitta, C. V. (2006).** The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol.* **27**:368-373.
- Yewdell, J. W. (2010).** Designing CD8+ T cell vaccines: it's not rocket science (yet). *Curr. Opin. Immunol.* **22**:402-410.
- York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., Rock, K. L. (2002).** The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* **3**:1177-1184.

York, I. A., Bhutani, N., Zendzian, S., Goldberg, A. L., Rock, K. L. (2006). Tripeptidyl peptidase II is the major peptidase needed to trim long antigenic precursors, but is not required for most MHC class I antigen presentation. *J. Immunol.* **177**:1434-1443.

Yuen, T. J., Flesch, I. E., Hollett, N. A., Dobson, B. M., Russell, T. A., Fahrner, A. M., Tschärke, D. C. (2010). Analysis of A47, an immunoprevalent protein of vaccinia virus, leads to a reevaluation of the total antiviral CD8⁺ T cell response. *J. Virol.* **84**:10220-10229.

Zweerink, H. J., Gammon, M. C., Utz, U., Sauma, S. Y., Harrer, T., Hawkins, J. C., Johnson, R. P., Sirotina, A., Hermes, J. D., Walker, B. D., Biddison, W. E. (1993). Presentation of endogenous peptides to MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells. *J. Immunol.* **150**:1763-1771.

Zweig, M. H., Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* **39**:561-577.